

Trabajo Fin de Grado

Caracterización alélica del locus CSD (*complementary sex determiner*) en un programa de mejora genética de la abeja negra ibérica (*Apis mellifera iberiensis*)

Characterization of CSD (complementary sex determiner) alleles in a breeding program of Iberian black honeybee (*Apis mellifera iberiensis*)

Autor/es

Pilar Blas Pérez

Director/es

Ester Sales Clemente
Jesús Yániz Pérez de Albéniz

En primer lugar, agradecer a mis directores, Dra. Ester Sales y Dr. Jesús Yániz, por haberme dado la oportunidad y privilegio de iniciar mi camino tanto en la investigación como en la apicultura de vuestra mano. Por la confianza depositada en mí, por todos los conocimientos que me habéis transmitido a lo largo de este tiempo y por todas las horas que me habéis dedicado.

A Asun, Belén y Macu por mis continuas idas y venidas al laboratorio y por su apoyo y sonrisa día tras día.

A Rubén por demostrarme que sí era posible y por todo el apoyo y ayuda que me ha brindado durante este tiempo.

Por último, a mis familiares, amigos y compañeros por su constante apoyo, ayuda y consejos.

Muchas gracias a todos.

Este proyecto ha sido financiado por el Grupo BIOFITER (Biología, Fisiología y Tecnologías de la Reproducción) con ayuda de los fondos de la DGA-FSE (A07_17RI)

Índice general

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 EL ORIGEN DE LAS ABEJAS Y DE LA APICULTURA	5
1.2 <i>APIS MELLIFERA</i>	7
1.3 LA ABEJA NEGRA IBÉRICA: <i>APIS MELLIFERA IBERIENSIS</i>	9
1.4 EL SECTOR APÍCOLA EN ESPAÑA	10
1.5. IMPORTANCIA DE LA APICULTURA EN EL MEDIO AMBIENTE Y SITUACIÓN ACTUAL	12
1.6 MEJORA GENÉTICA DE LA ABEJA MELÍFERA	14
1.7 LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL SEXO EN <i>APIS MELLIFERA</i>	16
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	23
3.1 TOMA DE MUESTRAS	23
3.2 AISLAMIENTO DE ADN DE ZÁNGANOS DE <i>A. MELLIFERA IBERIENSIS</i>	24
3.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL MARCADOR DEL GEN <i>CSD</i>	26
3.4 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS AMPLIFICADAS	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN <i>CSD</i>	29
4.2 SECUENCIACIÓN DE LAS REINAS DE LA PRIMERA GENERACIÓN.	30
4.3 SECUENCIACIÓN DE LAS LÍNEAS SELECCIONADAS	36
4.3.1 Línea de mejora de la reina Y11	36
4.3.2 Línea de mejora de la reina Y13	40
4.4 SECUENCIACIÓN DE LAS REINAS PROCEDENTES DEL APIARIO DE NUENO. LÍNEA DE MEJORA AB	43
5. CONCLUSIONES	51
6. BIBLIOGRAFÍA	53

Índice de figuras

Figura 1. Pintura rupestre de la Cueva de la Araña, en Bicorp (Valencia). Foto: Cristina Sáez	6
Figura 2. Grabado de un recolector de miel en la Tumba de Pabusa (Antiguo Egipto)	6
Figura 3. Distribución de las nueve especies de abejas en el mundo. Fuente: Jean-Prost y Medori, 2007	7
Figura 4. Distribución de subespecies de <i>Apis mellifera</i> en Europa y Asia sudoccidental. Fuente: Jean-Prost y Medori, 2007	8
Figura 5. <i>Apis mellifera iberiensis</i>	9
Figura 6. A la izquierda la proporción de producción de miel por continente (promedio de 2007 a 2017). A la derecha, la proporción de producción de cera por continente (promedio 2017 a 2017)	10
Figura 7. Distribución por CCAA del número de colmenas en España en el año 2017. Fuente: MAPA (2018)	11
Figura 8. Evolución histórica de la producción de miel y cera en España. Fuente: MAPA (2018)	11
Figura 9. Evolución del consumo aparente per cápita y del abastecimiento de miel en España. Fuente: MAPA (2018)	12
Figura 10. Sexo y genotipos de los alelos determinantes del sexo en cruces con consanguinidad en <i>A. mellifera</i> .	18
Figura 11. Toma de muestras de larvas de zánganos en cuadros de puesta.	23
Figura 12. Esquema de selección de reinas de <i>Apis mellifera iberiensis</i> realizado en un apiario localidado en Aniés (Huesca) durante los años 2018 y 2019.	24
Figura 13. Electroforesis de 7 muestras de ADN de tórax (T) y abdomen (A) de zánganos de <i>Apis mellifera iberiensis</i> obtenidas mediante el protocolo CTAB. M, marcador de pesos moleculares λ DNA HindIII/EcoRI.	29
Figura 14. Electroforesis de 7 productos de la amplificación del gen <i>csd</i> a partir de muestras de ADN de abdomen (A) y de tórax (T) de zánganos de <i>Apis mellifera iberiensis</i> . M, marcador de pesos moleculares; Ø, muestra de control negativo (sin ADN).	30
Figura 15. Dendrograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 14 alelos <i>csd</i> de 7 abejas reinas de <i>Apis mellifera iberiensis</i> seleccionadas en 2018. En rojo aparecen los alelos de las 2 reinas seleccionadas para continuar con el programa de mejora.	32
Figura 16. Dendrograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre 133 secuencias parciales del gen <i>csd</i> de distintas subespecies de <i>Apis mellifera</i> : 48 secuencias de <i>A. m. mellifera</i> , 22 de <i>A. m. carnica</i> , 20 de <i>A. m. ligustica</i> , 10 de <i>A. m. caucasica</i> , 14 de <i>A. m. carpatica</i> , 6 de <i>A. m. anatoliaca</i> y 13 de <i>A. m. iberiensis</i> .	33

Figura 17. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos correspondientes al exón 7(A) y al 8 (B) de los alelos csd de 7 reinas de <i>A. m. iberiensis</i> de la primera generación de selección.	35
Figura 18. Dendograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 11 alelos csd de las 6 abejas reinas de <i>Apis mellifera iberiensis</i> pertenecientes a la línea de mejora de la reina Y11. En rojo aparecen los alelos de esta reina, en azul los alelos pertenecientes a las reinas del primer ciclo de selección y en verde los alelos de las reinas del segundo ciclo de selección.	37
Figura 19. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos codificadas por el exón 7 (A) y por exón 8 (B) de los alelos csd de las abejas reinas de <i>A. m. iberiensis</i> pertenecientes a la línea de selección Y11.	38
Figura 20. Dendograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 10 alelos csd de las 5 abejas reinas de <i>Apis mellifera iberiensis</i> pertenecientes a la línea de mejora de la reina Y13. En rojo aparecen los alelos maternos y en azul los alelos pertenecientes a las reinas del primer ciclo de selección.	40
Figura 21. Secuencias de aminoácidos alineadas codificadas por el exón 7 (A) y por exón 8 (B) de los alelos de las abejas reinas de <i>A. m. iberiensis</i> pertenecientes a la línea de selección Y13.	41
Figura 22. Alineamiento de las proteínas obtenidas de la traducción de los exones 7 y 8 de los alelos Y11-B e Y40-A	42
Figura 23. Alineamiento de las proteínas obtenidas de la traducción de los exones 7 y 8 de los alelos Y11-a e Y38-A	43
Figura 24. Dendograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 3 alelos del marcador CSD de las 2 abejas reinas de la subespecie <i>Apis mellifera iberiensis</i> pertenecientes a la línea de mejora AB. En naranja los alelos de la reina AB346 y en morado los de AB359.	44
Figura 25. Secuencias de aminoácidos alineadas codificadas por el exón 7 (A) y por exón 8 (B) de los alelos pertenecientes a la línea de selección AB.	45
Figura 26. Dendograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 18 alelos csd de las 10 abejas reinas de <i>Apis mellifera iberiensis</i> pertenecientes a la línea de mejora de las reinas Y11, Y13, AB346 y AB349. En verde aparecen los alelos de las reinas pertenecientes a la línea Y11, en azul los de la línea Y13, en naranja los de la línea AB346 y en morado los de la línea AB359.	46
Figura 27. Secuencias de aminoácidos alineadas codificadas por el exón 7 (A) y por exón 8 (B) de los alelos pertenecientes a las reinas seleccionadas para el cruce entre los colmenares de Aniés y Nueno.	48

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados del BLAST para los 14 alelos del gen *csd* de las 7 reinas seleccionadas en un apiario de *Apis mellifera iberiensis* en 2018. _____ 31

Tabla 2. Resultados del BLAST realizado con los 3 alelos *csd* de las 2 reinas de la línea de mejora AB seleccionada del apiario de *Apis mellifera iberiensis* localizado en Nueno. _____ 44

Resumen

Apis mellifera iberiensis es la subespecie de abeja más común en la Península Ibérica. Sin embargo, debido a la introducción de abejas foráneas por parte de los apicultores, se pueden perder ecotipos locales de esta subespecie autóctona. Para evitarlo se desarrollan estrategias de conservación y de mejora genética de las cualidades productivas de esta subespecie, lo que hace necesario llevar a cabo programas de selección y de cría artificial de reinas. Una limitación de estos programas es que *Apis mellifera* es muy sensible a la endogamia, y en particular a la homocigosis en el gen que determina el sexo, que se manifiesta por fallos en los cuadros de puesta, el denominado “pollo lagunar”. La región terminal del gen *csd*, *complementary sex determiner*, es la que determina la diversidad y especificidad alélica. Para su amplificación y secuenciación, previamente se llevó a cabo la puesta a punto del protocolo de extracción de ADN de suficiente calidad a partir de pupas de zánganos mediante el método Chelex® o un tampón CTAB. En este trabajo se evaluó la variabilidad genética existente para este locus en siete abejas reinas seleccionadas en 2018 en un colmenar de la provincia de Huesca, encontrándose elevadas tasas de polimorfismo. La selección continuó a partir dos de estas colmenas mediante cría artificial de reinas, y también se realizaron inseminaciones artificiales, dando lugar a dos líneas de mejora. La secuenciación de los alelos sexuales en estas familias permitió realizar un seguimiento de la genealogía y se pudo determinar que se había producido el reemplazo de la reina introducida en la mayor parte de las colmenas. Este resultado apunta la necesidad de acortar los plazos en cuanto al seguimiento de la reina y a la obtención de descendencia. También se observó que varias reinas de las líneas seleccionadas compartían uno de sus alelos *csd*, así como con las dos líneas seleccionadas en otro colmenar, que se pretenden hibridar en este año. Esto redujo significativamente las posibilidades de cruces entre los individuos de las colmenas seleccionadas.

Palabras claves: alelos sexuales, gen *csd*, selección, cría de reinas, inseminación artificial.

Abstract

Apis mellifera iberiensis is the most common honeybee subspecies in the Iberian Peninsula. However, due to the introduction of foreign honeybees by the beekeepers, local ecotypes of this native subspecies could be lost. In order to avoid it, conservation strategies and genetic improvement of the productive qualities of this subspecies are being developed. This makes necessary to carry out queen's selection and rearing programs. A limitation of these programs is that *Apis mellifera* is very sensitive to inbreeding, specially to homozygosis in the complementary sex determiner (csd) gene, evident in a failure that results in a typical brood pattern in honey bee colonies that beekeepers refer to as shoot brood. The terminal region of csd gene is what determines the allelic diversity and specificity. For its amplification and sequencing, previously it is necessary the development of a DNA extraction protocol in order to obtain high quality DNA from drone larvae through Chelex® method or using a CTAB buffer. In this project it is evaluated the genetic variability for this locus in seven queens selected in 2018 from an apiary in the province of Huesca and high rates of polymorphism were found. The selection continued with two of these beehives through queens' rearing. Also, two instrumental insemination procedures were done, leading into two improvement lines. The sequencing of the sexual alleles in these families allowed us to track the genealogy and to determine that the substitution of the queen had occurred in the majority of the beehives. This result points to the necessity to shorten the deadlines of the queen's tracing and the offspring obtention. It was also observed that several queens from the selected lines shared one of her two csd alleles, as well as they shared it with the two selected lines from other apiary, that is intended to hybridize this year. This significantly reduces the possibilities of hybridization between queens and drones from the selected beehives.

Keywords: csd gene, instrumental insemination, selection, sexual alleles, rearing of queen bees.

1. Introducción

1.1 El origen de las abejas y de la apicultura

El origen preciso de las abejas es desconocido ya que los fósiles de insectos son muy escasos y la mayoría se encuentran en forma de impresiones en ámbar. Una de las hipótesis planteadas sobre su origen es que provienen de avispa carnívoras que habrían cambiado su alimentación al empezar a consumir el polen que les ofrecían las flores primitivas. Este cambio de alimentación también habría supuesto el inicio de su cambio morfológico, de forma que habrían sobrevivido las nuevas especies que habían aparecido debido a mutaciones genéticas que les permitían una mejor adaptación a las nuevas condiciones ambientales y a su nueva alimentación, que se encontraba cada vez más vinculada a las flores. Estos cambios morfológicos incluían un aumento en el desarrollo de los cestillos del polen, la lengua y el buche, lo que les facilitaba recolectar y transportar el néctar y el polen, y que también dieron lugar a numerosas especies de abejas que estaban más o menos adaptadas a la vida en común a las plantas. Al mismo tiempo que se producían estos cambios en la alimentación también se producían cambios en su organización, dejando de ser un insecto solitario y transformándose en un insecto social. Todos estos cambios evolutivos de la abeja se han ido sucediendo hasta alcanzar la actual especie *Apis mellifera* (Sepúlveda, 1986).

Indistintamente a su origen, el hombre se ha familiarizado con la abeja melífera, a diferencia del resto de los insectos, pues siempre ha despertado su curiosidad y admiración a lo largo de todos los tiempos y en todos los ámbitos de la ciencia y la cultura. Se encuentran evidencias de la domesticación de las abejas en varias culturas, de forma que el hombre comienza a intervenir en la colonia, aparte de para la recolección de la miel, para el control de la evolución y desarrollo del colmenar. Esta explotación de la abeja melífera por parte del hombre se es muy antigua, y el registro más antiguo conocido de tal actividad se encuentra precisamente en una pintura del paleolítico (Figura 1) encontrada en la Cueva de la Araña en Bicorp (Valencia) en la que se puede apreciar lo que parece ser de una mujer recolectando miel mientras grupo de abejas revolotea a su alrededor (Benedetti & Pieralli, 1990).



Figura 1. Pintura rupestre de la Cueva de la Araña, en Bicorp (Valencia). Foto: Cristina Sáez

En la mayoría de las culturas y civilizaciones a lo largo de la historia la apicultura ha tenido gran importancia y muchas de ellas han contribuido a su estudio y avance. En el Antiguo Egipto la abeja tenía un significado sagrado, además se ha podido saber que utilizaban humo para la extracción de la miel y la cera, sin necesidad de recurrir al apicidio (Figura 2). Estos productos, miel y cera tenían también fines medicinales y se utilizaban en las ceremonias de embalsamamiento. La apicultura también tuvo un gran avance con los griegos y romanos, de los han llegado hasta nuestros días testimonios como los de Columela. En su libro *“De re rustica”* dejó testimonio sobre la cría de las abejas. Sin embargo, a excepción de algunos descubrimientos significativos como la determinación del sexo femenino de la reina en 1600 por Butler, la investigación en la apicultura es muy reciente, destacando el trabajo del biólogo alemán Karl Von Frisch, que describió el lenguaje de las abejas (danza de la abeja), por el que se le otorgó en 1973 el Premio Nobel de Biología (Sepúlveda, 1986; Benedetti & Pieralli, 1990).

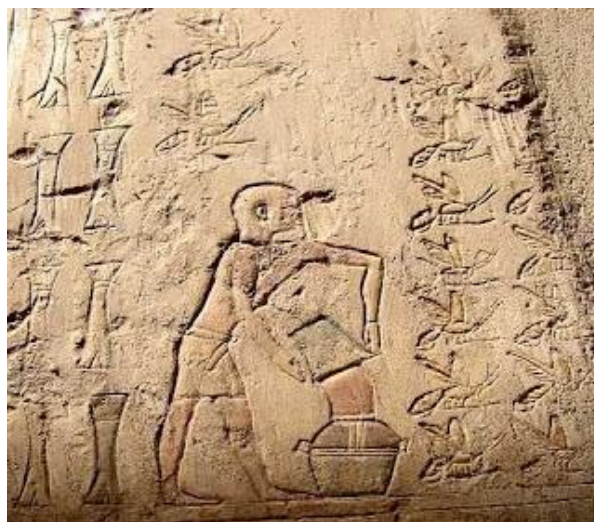


Figura 2. Grabado de un recolector de miel en la Tumba de Pabusa (Antiguo Egipto)

1.2 *Apis mellifera*

La abeja melífera, como se ha mencionado, es la especie *Apis mellifera*. En realidad, el género *Apis* comprende nueve especies de las que destacan cuatro por su producción de miel y cera: *Apis dorsata*, *A. florea*, *A. cerana* y *A. mellifera* (Figura 3). Todas las especies poseen la misma dotación cromosómica (16), siendo las dos primeras abejas salvajes (Sepúlveda, 1986; Prost y Medori, 2007) y *A. mellifera* la especie más extendida para su aprovechamiento por parte del hombre.

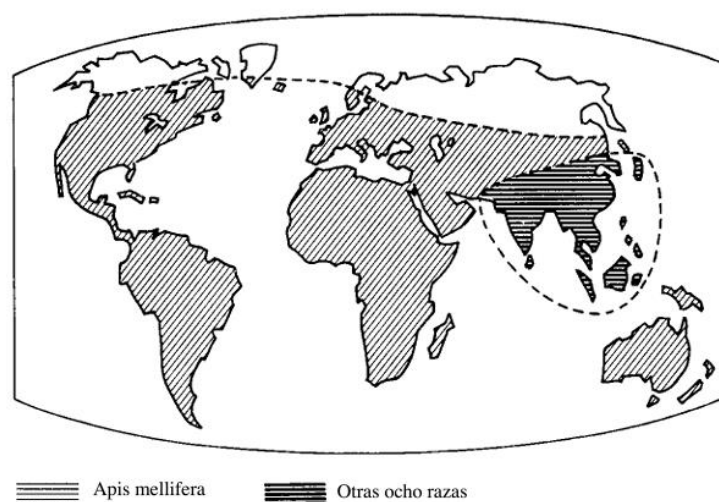


Figura 3. Distribución de las nueve especies de abejas en el mundo. Fuente: Jean-Prost y Medori, 2007

Apis mellifera, cuyo nombre latino fue dado por Linneo en 1758 en su *Systema Naturae* y quiere decir “portadora de miel”, es una especie que presenta una gran diversidad, habiéndose descrito distintas subespecies de la misma. Se trata de agrupaciones que presentan características diferenciales propias y que se localizan en determinadas áreas geográficas a las que se encuentran adaptadas (a su clima, vegetación y otros componentes bióticos). Las subespecies se diferencian a simple vista por su coloración negra, amarilla o grisácea. Actualmente se conocen 29 subespecies de *Apis mellifera* (Figura 4), entre las que se encuentran en Europa *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* y *A. m. iberiensis*, entre otras (Sepúlveda, 1986; Prost y Medori, 2007).

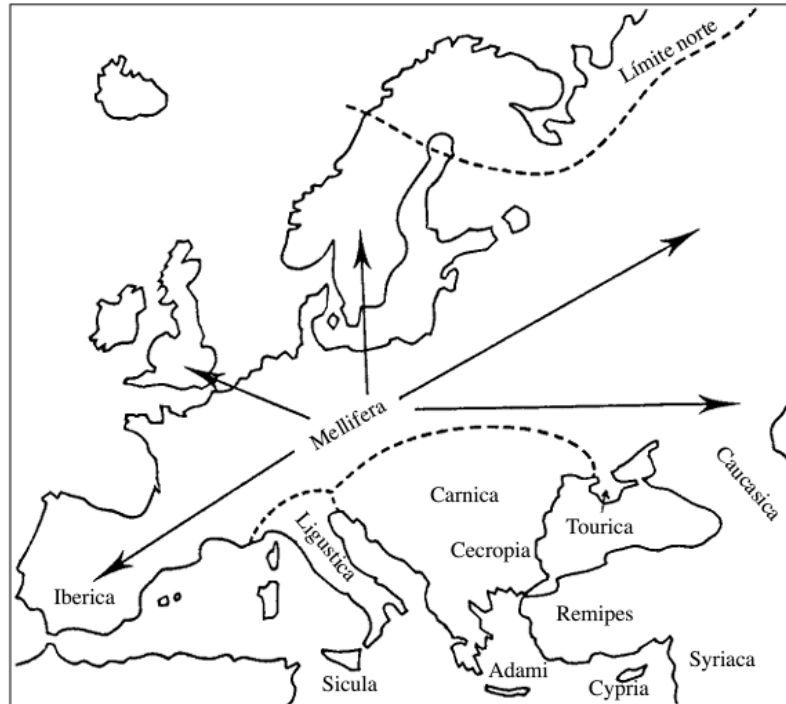


Figura 4. Distribución de subespecies de *Apis mellifera* en Europa y Asia sudoccidental. Fuente: Jean-Prost y Medori, 2007

Por otro lado, se diferencian en *Apis mellifera* cinco linajes evolutivos basándose en evidencias morfométricas, moleculares, ecológicas, etológicas y fisiológicas. Cuatro de estos linajes se dan de forma natural en la cuenca del Mediterráneo: linaje africano (A), linaje de Europa occidental y del norte (M), linaje de Europa sudoriental (C) y linaje de Oriente Próximo y Medio (O) (Cánovas *et al.*, 2007). Esta clasificación ha sido confirmada por estudios de marcadores moleculares del ADN mitocondrial, que recientemente mostraron además de los cuatro linajes clásicos una quinta rama evolutiva adicional (Meixner *et al.*, 2013), llamada Y (Yemenítica de Etiopía) y una sexta Z que comprende poblaciones de Libia (Péntek-Zakar *et al.*, 2015). Estos estudios han contribuido también a clarificar el origen de la abeja negra ibérica, la subespecie propia de la Península, a partir de las subespecies *A. m. intermissa* (abejas africanas del linaje A) y *A. m. mellifera* (abejas de Europa occidental del linaje M), siendo la abeja negra ibérica *A. m. iberiensis*, una subespecie con características fenotípicas diferenciadas que presenta poblaciones con haplotipos tanto del linaje A como del M (Miguel *et al.*, 2010).

1.3 La abeja negra ibérica: *Apis mellifera iberiensis*

Apis mellifera iberiensis es la subespecie de abeja más común en la Península Ibérica (Figura 5), siendo originada, como se ha comentado, por la hibridación natural entre poblaciones de los linajes A y M de *Apis mellifera*. Distintos estudios morfométricos y de comportamiento, así como análisis de enzimas, marcadores del ADN mitocondrial, microsatélites y SNPs, señalan que la abeja ibérica es el resultado de una amplia intergradación entre las abejas del linaje M que sobrevivieron a la última glaciación y de las abejas del norte de África del linaje A que colonizaron el suroeste de Europa. Es decir, esta hipótesis supone que el linaje M sobrevivió a la última era de glaciación y, tras ello, inició una expansión hacia el norte, dándose al mismo tiempo varias oleadas colonizadoras de abejas procedentes de África (linaje A). Esta hibridación dio lugar a la distribución actual de los haplotipos A en el sur y el oeste de la Península, y M en el norte y el este para *A. m. iberiensis* (Cánovas *et al.*, 2011; Chávez-Galarza *et al.*, 2015). En cualquier caso, los estudios genómicos más recientes basados en SNPs mostraron que *A. m. iberiensis* está más próxima a la abeja negra europea *A. m. mellifera* (Wallberg *et al.* 2014).



Figura 5. *Apis mellifera iberiensis*

La abeja negra ibérica se caracteriza por presentar una muy buena actividad pecoreadora, siendo esta su condición más sobresaliente. Así, mientras otras razas se mantienen recluidas con condiciones climatológicas adversas, la abeja ibérica se mantiene en actividad. Además, también se muestra en actividad durante todas las horas de luz del día. Respecto al periodo de invernada, son muy buenas invernadoras ya que se mantienen en actividad, exceptuando los días de vientos fríos, y mantienen el nido con

vitalidad gracias a la estructura compacta del enjambre. En general, se trata de abejas manejables con un buen uso del ahumador y con poca tendencia al pillaje. Las reinas de abeja ibérica son robustas y tranquilas, muy buenas ponedoras. Presentan las bandas de los cuatro primeros segmentos abdominales más claros. Las obreras, en general, son grisáceas, con algunas tonalidades más oscuras, robustas, de agresividad media y con un comportamiento algo nervioso. Son muy resistentes y activas en su trabajo, e identifican bien su colmena (Sepúlveda, 1986).

1.4 El sector apícola en España

La cría de abejas para el aprovechamiento de productos como la miel y la cera es una actividad extendida a nivel global. En la última década, de acuerdo con los datos recopilados por la FAO, Asia es el continente con mayor producción media (45,8% de la producción que suponen 762,84 mil t de miel), así como de cera, acaparando el 46% de la producción (28,8 mil t) (Figura 6). China es el país con mayor producción de miel (447,21 mil t), mientras que India lo es en producción de cera (22,45 mil t).

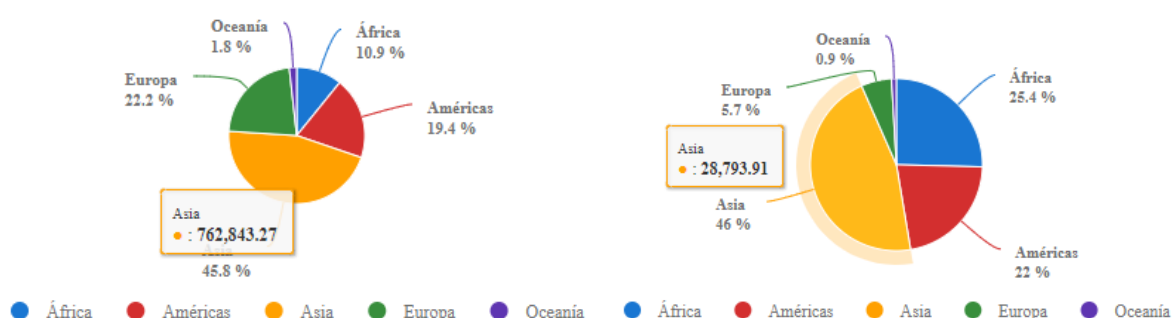


Figura 6. A la izquierda la proporción de producción de miel por continente (promedio de 2007 a 2017). A la derecha, la proporción de producción de cera por continente (promedio 2017 a 2018)

En España, de acuerdo con los datos aportados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el sector apícola supone en torno al 0,44% de la Producción Final Ganadera y el 0,17% de la Producción Agraria, con un valor anual de su producción de unos 62 millones de euros (MAPA, 2018). En los últimos años se ha dado un crecimiento constante tanto en el número de colmenas, de explotaciones (han aumentado alrededor de un 40% en el periodo de 2010-2018) y de apicultores.

En el año 2017, en España había más de 31.000 apicultores, de los cuales, sin embargo, solo el 18% eran profesionales. El enfoque por sistema productivo de las explotaciones apícolas de las distintas Comunidades Autónomas se puede diferenciar en dos grupos: la zona norte y noroeste que se caracteriza por un alto número de apicultores

pequeños o no profesionales y que en su mayoría no practican la trashumancia; y la zona centro y sur de la península que presenta un mayor grado de especialización y es mayoritariamente trashumante.

El censo de colmenas en España asciende a más de 2,8 millones, lo que supone alrededor del 16% de las colmenas de la UE. Casi el 50% de se localizan entre las Comunidades Autónomas de Extremadura, Andalucía y Castilla y León (Figura 7). En concreto más del 70% de la producción total de miel en España se distribuye entre 4 CCAA: Andalucía (21,1%), C. Valenciana (19,6%), C. León (15,8%) y Extremadura (10,7%).

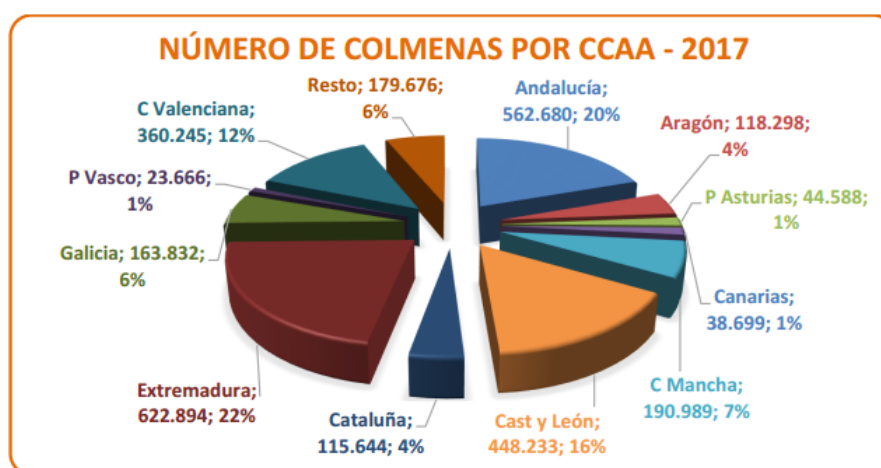


Figura 7. Distribución por CCAA del número de colmenas en España en el año 2017. Fuente: MAPA (2018)

La producción de miel en España en 2016 fue de más de 31 millones de t, un 7,2% inferior respecto a la campaña de 2015, pues se encuentra muy influenciada por las condiciones climáticas. La producción de cera, sin embargo, se mantiene estable desde hace casi dos décadas (Figura 8).

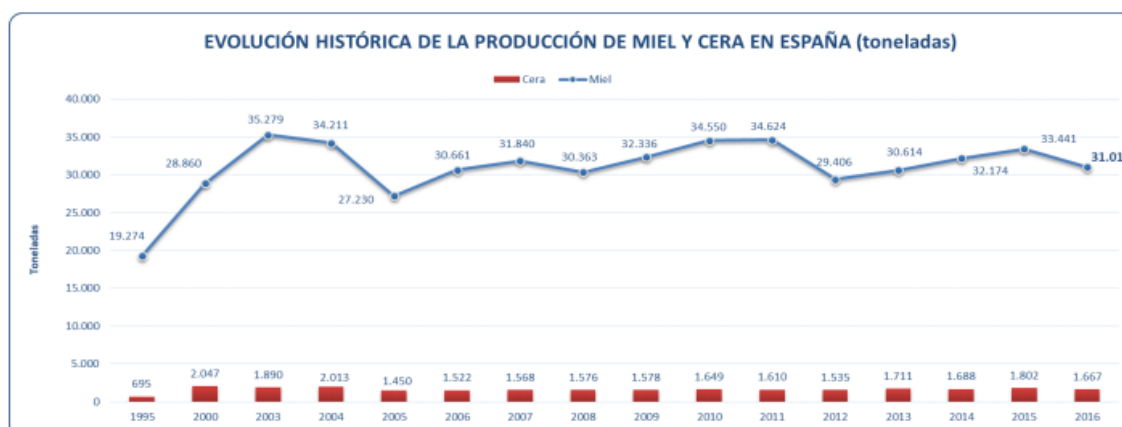


Figura 8. Evolución histórica de la producción de miel y cera en España. Fuente: MAPA (2018)

Respecto al comercio de la miel, las exportaciones han ido creciendo gradualmente en los últimos años, sin embargo, en el año 2017 se produjo un descenso de las mismas y aumentaron las importaciones, principalmente de China. En cuanto a los principales destinatarios de la miel exportada en 2017 se encuentran Francia, Alemania y Portugal dentro de la UE, y entre los países extracomunitarios destacan Arabia Saudí y Marruecos.

En relación con el consumo de miel, en España se ha mantenido estable en los últimos años, situándose en torno a los 430 gr/año per cápita. El nivel de autoabastecimiento en los últimos años se encontraba próximo al 100%, mientras que en el resto de la UE se encuentra en el 65% (Figura 9).

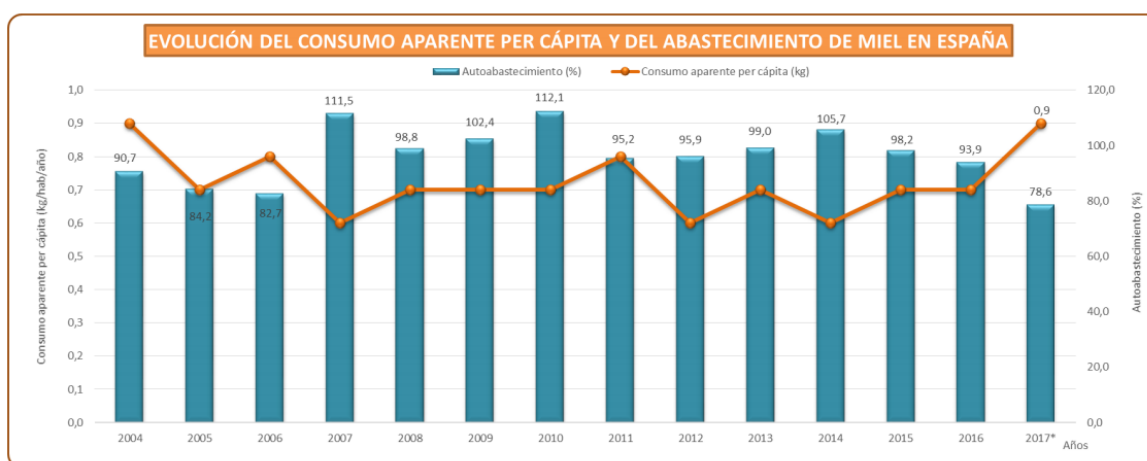


Figura 9. Evolución del consumo aparente per cápita y del abastecimiento de miel en España. Fuente: MAPA (2018)

El precio en España de los distintos tipos de mieles es muy variable, siendo el precio medio por kilo al consumidor de 5,98€ en el año 2017.

1.5. Importancia de la apicultura en el medio ambiente y situación actual

Puesto que se estima que la práctica totalidad de la población mundial de abejas melíferas corresponde a las que se mantienen en colmenas por parte de los apicultores, esta actividad económica incide de forma decisiva en el ecosistema. La abeja melífera tiene una gran importancia en la polinización tanto de plantas cultivadas como de las silvestres, siendo el insecto que con mayor eficacia realiza esta labor, pues suponen entre el 75-90% de las visitas de insectos que reciben las plantas. En la abeja, tanto su conformación como costumbres se encuentran adaptadas a esta función, además de presentar una alta aclimatación a cualquier tipo de flora, llegando prácticamente a establecer una relación de mutualismo entre ellas y las flores. Asimismo, contribuyen a

establecer un equilibrio ambiental, especialmente en el medio agrícola (Benedetti & Pieralli, 1990).

La importancia de la apicultura por lo tanto, va más allá de la producción de miel y cera, siendo la agricultura la principal beneficiaria de la labor realizada por las abejas, pues prácticamente todos los cultivos, a excepción de algunos pocos como las gramíneas, dependen de la actividad polinizadora de las abejas. En los frutales, además, la polinización cruzada realizada por las abejas contribuye a mejorar la calidad comercial del fruto (Benedetti & Pieralli, 1990).

A pesar de la gran importancia de estos insectos como polinizadores y como productores, el declive a nivel mundial del número de abejas, tanto silvestres como domésticas, es cada vez más notable, en especial en Norteamérica y Europa. La mayoría de las causas de este descenso son ocasionadas por los cambios que la actividad humana provoca en el medio: continua extensión de las áreas urbanas, deforestación, cambios en la agricultura y el aumento del uso de pesticidas para controlar las plagas, la invasión de la avispa asiática que ataca las colmenas, la incidencia de parásitos como el ácaro *Varroa destructor* y el microsporidio *Nosema apis*, así como el cambio climático. Recientemente se ha producido de forma repetida y a nivel mundial la muerte de numerosas colonias de abejas en las colmenas, fenómeno conocido como *Colony Collapse Disorder (CCD)* o síndrome de despoblamiento de colmenas (SDC). Esta pérdida de colonias ocurre durante el invierno y supone una mortalidad de alrededor del 20% anual de media en Europa, pudiendo llegar al 50% en algunos países y años concretos (Yániz *et al.*, 2016). La gravedad del fenómeno ha llevado a que se realicen numerosas investigaciones y esfuerzos para la conservación de los recursos genéticos de esta especie, incluyendo la creación de una asociación que comprende a investigadores y profesionales de 95 países, entre los que se encuentra España, denominada COLOSS (<https://coloss.org/>), que desarrolla y publica los métodos más adecuados para el manejo y la investigación en apicultura, el denominado *Beebook* (<https://coloss.org/core-projects/beebook/>).

Gracias a estas investigaciones se ha podido establecer el origen multifactorial del SDC, y el hecho de que la falta de diversidad genética de los linajes de abejas más utilizados en la apicultura actual es un factor de gran importancia en la incidencia de este fenómeno (Ellis *et al.*, 2010; Meixner *et al.*, 2010; López-Urbe *et al.*, 2017). El descenso en la variabilidad genética de las abejas melíferas se debe a la búsqueda y selección, por parte de los apicultores, de una abeja que sea mansa, trabajadora y que se adapte bien a vivir en las colmenas hechas por el hombre, características que cumplen particularmente dos subespecies europeas de *Apis mellifera*: *Apis mellifera ligustica* de Italia y *A. m.*

carnica de los Balcanes. Estas dos subespecies predominan en la apicultura de todo el mundo, habiéndose realizado programas de mejora genética mediante selección e hibridación que han dado lugar a nuevas razas e híbridos como la abeja *Buckfast*. Estas razas mejoradas son comercializadas por apicultores de todo el mundo, lo que implica una disminución de la diversidad genética, que hace que las abejas sean más susceptibles a los pesticidas y enfermedades, así como que tengan una menor capacidad para adaptarse a eventuales cambios en el medio ambiente (Yániz *et al.*, 2016). En algunas regiones de Europa Occidental se ha producido la sustitución de las abejas de los ecotipos locales por abejas introducidas, por lo que se han implantado programas de conservación de *Apis mellifera mellifera* para evitar la pérdida de biodiversidad y con ella las adaptaciones que han desarrollado estos insectos (De la Rúa *et al.*, 2009). En este sentido, la abeja negra ibérica presenta una escasa contaminación genética externa, particularmente en el norte de España. En un estudio realizado hace una década únicamente se encontraron en la provincia de Huesca abejas de *A. mellifera iberiensis* del haplotipo M. Sin embargo, en los últimos años se ha dado una continua introducción, por parte de los apicultores, de reinas de las subespecies italiana y carniola. La introducción de reinas seleccionadas y la trashumancia de colmenares entre regiones (en Huesca procedentes de Levante y también de Francia) han causado un aumento de la aparición de híbridos de la abeja negra ibérica con otras especies foráneas, lo que supone un riesgo de conservación de la subespecie autóctona (Yániz *et al.*, 2016).

1.6 Mejora genética de la abeja melífera

Desde los inicios de la apicultura el hombre, al igual que ha hecho con el resto de animales y plantas domésticos, ha ido seleccionando a las mejores abejas de acuerdo a sus características productivas, ya fuera por la alta producción de miel, mansedumbre, actividad pecoreadora, resistencia a distintas enfermedades, etc.

A diferencia de otros animales domésticos, en los que el macho es el centro de la selección, en la apicultura lo es la abeja reina, siendo por ello necesario llevar a cabo programas de cría y selección de reinas. En la naturaleza la reina se desarrolla en una realera construida por las obreras donde se encuentra la larva real, que es alimentada con jalea real hasta que completa su desarrollo, momento en el cual la realera es operculada por las obreras para que tenga lugar la ninfosis. Terminado el desarrollo completo (a los 15 – 17 días desde la puesta) la reina emerge de la realera. Esta cría de reinas puede deberse al envejecimiento de la existente o a la pérdida accidental de la

misma, y también puede ser provocada por el apicultor. De cualquier forma, la nueva reina al nacer matará a sus reinas hermanas, si se ha producido la cría masiva de reinas, o impedirá su nacimiento (Benedetti & Pieralli, 1990). Las técnicas de cría artificial de reinas por parte del apicultor son relativamente recientes, dándose los primeros intentos a finales del siglo XIX. En 1890 Doolittle desarrolló un sistema (Método Doolittle) que es utilizado en todo el mundo en la actualidad (Benedetti & Pieralli, 1990) y permite a los apicultores para repoblar colonias de forma regular, reducir la enjambrazón, aumentar la producción de crías y miel, así como cambiar ciertas características genéticas seleccionando larvas de las colmenas más adecuadas, es decir, hijas de las mejores reinas. El método Doolittle consiste en tomar una larva joven de menos de 1 día de edad de un panal de puesta de obreras y trasvasarla a una celda real suspendida donde es alimentada con jalea real por las obreras. Trascurridos 11-12 días, la reina emerge y puede ser transferida a un núcleo huérfano que se pretende recuperar, o bien a otro en el que se quiere cambiar de reina porque ya no es productiva debido a su edad o a una excesiva puesta de zánganos, por ejemplo (Büchler *et al.*, 2013). Tras introducir la nueva reina se debe realizar un seguimiento del colmenar para asegurarse de que es aceptada por las obreras y no es reemplazada por otra reina de enjambrazón natural.

La cría de reinas permite, como se ha mencionado, seleccionar las larvas en las colmenas más productivas. El avance genético que se consigue de esta forma es lento, dado que la selección se practica únicamente en la línea materna. Cuando se combina con la técnica de la inseminación artificial (IA), es posible la selección también en la línea paterna, usando zánganos de otras reinas seleccionadas, lo cual permite un avance genético más rápido. Las primeras IA de reinas de *A. mellifera* llevadas a cabo con éxito se remontan a 1927. Desde entonces, el mejor conocimiento de la anatomía y fisiología de las abejas reinas y de los zánganos ha permitido el perfeccionamiento de la técnica (Prost y Medori, 2007).

Las técnicas de IA hacen posible llevar a cabo cruces que naturalmente tendrían poca probabilidad de darse, y que permiten avanzar tanto en las investigaciones como en la cría. La técnica básica de IA no ha cambiado prácticamente desde su desarrollo en 1950, y requiere de un equipo especializado para anestesiarse e inmovilizar a la reina, de forma que sea posible inseminarla, normalmente con el semen de varios zánganos seleccionados. El semen es obtenido por eversión manual del endofalo y recolectado con una jeringuilla (Büchler *et al.*, 2013). Las reinas fecundadas por IA son introducidas en las colonias y su rendimiento, si la técnica se ha realizado correctamente, puede ser igual al de una reina inseminada naturalmente (Cobey *et al.*, 2013).

Las reinas y zánganos utilizados en los programas de mejora genética se seleccionan de acuerdo con distintos caracteres que se quieran potenciar. Generalmente se realizan los cruces entre reinas y zánganos cuyas colmenas tengan cualidades productivas complementarias. Los caracteres habituales en los que se trabaja en mejora son evaluados por tanto a nivel de colonia, como por ejemplo la resistencia a enfermedades como la varroosis, el comportamiento higiénico, la producción de miel, la mansedumbre y la baja tendencia a la enjambrazón (Oxley y Oldroy, 2010; Kumar-Gupta *et al.*, 2014).

Sin embargo, los programas de mejora genética de la abeja melífera que se vienen realizando tienen dos importantes limitaciones: por un lado, la relativamente baja heredabilidad de los caracteres que se seleccionan, lo que da lugar a un avance lento, y por otro lado el sistema reproductivo de la especie dado que pueden aparecer problemas de depresión por consanguinidad en las colmenas, cuando la reducción en el número de progenitores que dan lugar a las descendencias seleccionadas implica una cierta reducción de la diversidad genética. *Apis mellifera* es una especie muy sensible a la endogamia, lo cual se manifiesta en una pérdida de vigor de la colmena y particularmente en la menor producción de zánganos que se da cuando los machos que han fecundado a la reina son genéticamente próximos a ella. El fenómeno se manifiesta por fallos en los cuadros de puesta y se denomina “pollo lagunar”, estando regulado por los alelos del gen que determina el sexo en las abejas, denominado *CSD*, *complementary sex determiner*.

1.7 La regulación de la expresión del sexo en *Apis mellifera*

La diferenciación sexual en animales es un proceso fundamental en el desarrollo, ya que no solamente supone la formación de un aparato reproductor diferente, sino que también afecta a otros aspectos como el comportamiento, la morfología y las diferencias fenotípicas entre sexos. Para que se dé esta diferenciación es necesaria una señal primaria que desencadene todos los consiguientes procesos regulatorios, siendo la determinación del sexo muy variable entre especies. En muchos animales, como la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) o muchas especies de mamíferos, esta determinación es desencadenada por los cromosomas sexuales, mientras que en los animales haplodiploides, que suponen alrededor del 20% incluyendo organismos como garrapatas, ácaros, trips, escarabajos y todos los insectos del orden Hymenoptera (unas 200.000 especies), la determinación del sexo depende del nivel de ploidía. Este tipo de

determinación sexual fue precisamente descrito por primera vez en la abeja melífera (Beye *et al.*, 2003).

En *Apis mellifera* las primeras observaciones sobre la determinación del sexo, es decir, sobre la diferenciación de machos y hembras, se iniciaron desde los tiempos de Aristóteles, pero no es hasta mediados del siglo XIX cuando surge el primer documento riguroso sobre el mecanismo de regulación del sexo, en el que su autor, el sacerdote Johann Dzierzon, describió cómo los machos de las abejas se desarrollaban de huevos sin fecundar. Este hallazgo se fundamentaba en las observaciones de que reinas vírgenes, que no habían realizado el vuelo para copular con los machos, daban lugar solamente a machos. De esto se dedujo que los cigotos haploides derivados de huevos no fecundados (solo con 16 cromosomas de la reina), se desarrollaban en zánganos, mientras que los diploides de huevos fecundados (32 cromosomas) formaban las obreras y, eventualmente, las reinas (Beye, 2004). Esta forma de reproducción supone que el macho hereda de forma aleatoria la mitad del genoma materno, mientras que las hembras heredan genes tanto de la madre como del padre, haciendo imposible que se dé un sistema de determinación del sexo basado en cromosomas.

La determinación del sexo en los organismos haplodiploides se encuentra controlada por un solo locus con múltiples alelos, *CSD*. El mecanismo de regulación (Figura 10) fue propuesto tras el hallazgo de machos diploides resultado de cruces de consanguinidad de la avispa *Barcon heinator*, en los que el 50% de los machos diploides provenía de huevos fecundados, lo que lleva a la existencia de una composición complementaria de los alelos de un único locus, y descarta que el proceso de fecundación de los huevos sea la señal primaria de la determinación del sexo. Los machos diploides surgen cuando los alelos del locus sexual son iguales, mientras que si estos alelos son distintos se da lugar a hembras. Los huevos sin fecundar dan lugar a machos que son hemicigóticos para este locus sexual. Cuando se producen machos diploides, según la especie animal, o bien no se pueden reproducir o pueden ser fértiles dando lugar a una descendencia triploide y por lo tanto estéril, ya que la espermatogénesis para los organismos haplodiploides es mitótica (Beye *et al.* 2003). En conjunto, la determinación del sexo haplo-diploide en *Apis mellifera* y en otras especies de Hymenoptera resulta de la diferenciación entre hemicigosis o heterocigosis para un solo locus *CSD* (van Wilgenburg *et al.*, 2006). Los machos diploides de *A. mellifera* son fértiles, pero son eliminados rápidamente por las obreras, dando lugar, como se ha comentado, a fallos en las puestas denominados “pollo lagunar”.

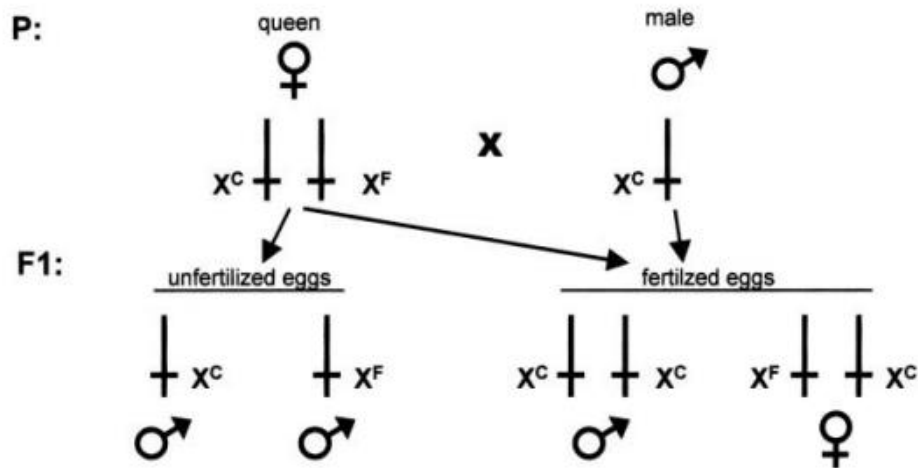


Figura 10. Sexo y genotipos de los alelos determinantes del sexo en cruces con consanguinidad en *A. mellifera*.

En *Apis mellifera* el locus CSD se mapeó en el extremo distal del cromosoma 3 y comprende cinco genes, de los cuales dos son los que controlan la expresión del sexo en la especie. El gen *csd* (BEEBASE: GB47022) ocupa 9.461 pb (11.771.679 - 11.781.139, hebra complementaria), contiene 9 exones que suponen un ARNm de alrededor de 1.200 nucleótidos y codifica un factor de *splicing* de 413 aminoácidos. Existen numerosos alelos *csd*, puesto que es la presencia de dos secuencias diferentes en los cromosomas de un embrión diploide lo que determina que se sintetice una proteína *csd* activa, funcional (Beye *et al.*, 2003). El gen *csd* procede de la duplicación de otro gen del locus, denominado gen *femenizer* (*fem*), que se encuentra 12 kb antes. En ausencia de una proteína *Csd* funcional en los primeros estadios de desarrollo del cigoto, no se procesan correctamente los pre-ARNm de *fem*, no se producen los ARNm adecuados y por lo tanto no se sintetiza la proteína *Fem*, ya que el transcrito de *fem* de la variante 'macho' tiene un codón de parada en el exón 3. Se mantiene entonces la opción por defecto del sistema, el desarrollo de machos. La inducción de la ruta femenina es mediada por la proteína *Fem* y se da cuando existen dos proteínas *Csd* que adoptan una conformación diferente porque difieren en los dominios de unión a proteína característicos de los factores de *splicing*. Para completar el desarrollo de una hembra la actividad *fem* se mantiene, sin participación de *Csd*, durante las fases de embrión, larva y pupa, parece que gracias a un *feedback* positivo de la propia proteína *Fem* (Gempe *et al.*, 2009). La función de esta proteína es dirigir a su vez el *splicing* de otro gen regulador del sexo, *Am-dsx*, el ortólogo en *Apis mellifera* del gen *doublesex* (*dsx*) de *Drosophila*, que codifica un factor de transcripción que regula la actividad de los genes que determinan la diferenciación masculina/femenina de las células somáticas. El *splicing* realizado por *Fem* da lugar a la variante específica de hembras de la proteína *Dsx*. Junto con *csd*, otro gen está implicado

en el *splicing* de los pre-ARN de *fem*, el gen *Am-tra2*, ortólogo en la abeja de *transformer2* de *Drosophila*, aunque la actividad de este gen no es dependiente del sexo (Nissen *et al.*, 2012).

La homocigosis en el gen *csd*, por tanto, es perjudicial para la colmena, puesto que en lugar de obreras se forman machos que además hay que eliminar. *Apis mellifera* ha desarrollado varias estrategias para limitar este problema. En primer lugar, la poliandria: la reina se aparea con 6-8 machos, de forma que el número de combinaciones alélicas en un apiario puede ser de hasta 12-16 (Kaskinova y Nikolenko, 2017). En segundo lugar, la propia selección en contra de los homocigotos, que se traduce en una mayor diversidad alélica. De hecho, el polimorfismo del gen *csd* es un ejemplo tipo de selección inversa dependiente de la frecuencia, en la que se mantienen múltiples alelos para un gen en una población porque los alelos raros tienen mayor probabilidad de dar lugar a descendencias viables.

Los estudios realizados en alelos naturales identificaron una región en el gen *csd* con selección positiva de variantes, PSD o *potential specifying domain*, que está codificado por los exones 6-8. Entre estos se encuentra la región hipervariable (HVR) que contiene diferente número de repeticiones de una secuencia con de una a cuatro asparaginas seguidas de una tirosina (Beye, 2004), es decir $N_{(1-4)}Y$. Los alelos que dan lugar a una proteína *Csd* activa, es decir, que presentan suficientes diferencias en la secuencia de aminoácidos, varían en al menos 5 aminoácidos en PSD y en la longitud de la HVR (Beye *et al.*, 2013). En concreto, Lechner *et al.* (2013) estimaron matemáticamente que pueden existir hasta 145 alelos diferentes del gen *csd*, y propusieron que el requerimiento mínimo para que existan diferencias funcionales entre alelos de *csd* podría estimarse mediante el criterio siguiente:

- Diferencia de longitud en la región hipervariable: $dHVR \geq 6$
- Sustituciones en la región PSD: $dPSD \geq 1$
- $3dPSD + 2de8 \geq 9$, siendo *de8* el número de sustituciones aminoacídicas en el exón 8.

En base a las secuencias analizadas, se ha diseñado un test para identificar los alelos de *csd*, como apoyo para evitar problemas de incompatibilidad en programas de mejora genética de la abeja melífera y en un contexto de reducción de la diversidad genética de la especie debido al síndrome de despoblamiento de colmenas (Hyink *et al.*, 2013). Este test consiste en la amplificación mediante PCR de un fragmento del gen que comprende parte del exón 6, el 7 y parte del 8, en 6 zánganos de cada reina de la que se pretenda conocer su genotipo para el locus *csd*. Posteriormente se digieren los productos

amplificados para discriminar los dos productos diferentes y proceder a su secuenciación. Empleando estas herramientas moleculares, Zareba *et al.* (2017) se centraron en el estudio de la HVR (en el exón 7) y determinaron que la distribución de los alelos de *csd* no fue uniforme al comparar dos regiones de Polonia. Estos autores consideraron como alelos diferentes aquéllos que diferían en al menos 5 aminoácidos de la región hipervariable y propusieron, además, que la variación alélica en este gen puede ser un mecanismo para mantener el equilibrio entre endogamia y exogamia en una población. En otro estudio, Wang *et al.* (2012) estudiaron la variabilidad del locus *csd* en seis subespecies de *A. mellifera* (no incluyeron *A. m. iberiensis*). En este trabajo, los haplotipos encontrados no se agruparon en función de la subespecie de procedencia, aunque se estimó un cierto grado de diferenciación entre ellas.

2. Justificación y objetivos

En el contexto actual de la apicultura en España, dada la amenaza que suponen para la conservación de los ecotipos locales de la abeja endémica *A. mellifera iberiensis* las prácticas de introducción de reinas de razas seleccionadas pertenecientes a otras subespecies y la trashumancia de colmenares entre regiones, se han impulsado distintas estrategias para su conservación, así como para implementar su expansión haciendo más atractivas sus cualidades productivas y potenciándolas. En concreto en la provincia de Huesca se ha creado una asociación de apicultores que trabajan con abeja negra ibérica, la Asociación Altoaragonesa para la Selección de la Abeja Negra (ASAN).

Esta asociación ha iniciado un programa de mejora de las abejas locales, de forma que varios apicultores seleccionan entre sus colmenares las colonias con mejores cualidades productivas y a partir de varias larvas de obreras de cada una realizan la cría de nuevas reinas, que son introducidas en el colmenar durante el inicio del verano. Las reinas de la nueva generación son de nuevo evaluadas en función de las características de su colmena, para un siguiente ciclo de selección. Los apicultores pueden intercambiar sus reinas con otros miembros de la asociación y así mantener la variabilidad genética.

En este Trabajo Fin de Grado se va a realizar un estudio de la variabilidad genética para el locus CSD en abejas reinas seleccionadas en 2018 y en 2019 en un colmenar de abeja negra ibérica de la provincia de Huesca, con el fin de evaluar la diversidad disponible y para realizar un seguimiento de la genealogía, de forma que sea posible diseñar los posibles cruzamientos mediante inseminación artificial. Para ello se emplearán los cebadores propuestos por Hynk *et al.* (2013) para la amplificación por PCR de la región terminal del gen *csd*. Los productos fueron secuenciados para 6 zánganos de cada reina, lo cual permitió conocer su genotipo para el locus.

Por lo tanto, el objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es la caracterización genética de los alelos sexuales en reinas seleccionadas de *Apis mellifera iberiensis* como apoyo en un programa de mejora genética de esta subespecie. Para alcanzar este objetivo principal se deben abordar una serie de objetivos específicos previos. Estos son:

- Poner a punto la metodología de aislamiento de ADN de zánganos de *A. mellifera iberiensis*.
- Poner a punto la metodología de amplificación parcial del marcador del gen *csd* mediante PCR y secuenciar los fragmentos obtenidos.

- En base a los resultados obtenidos, analizar de la diversidad alélica, comprobar las genealogías en el programa de selección y detectar los potenciales problemas en cruzamientos entre líneas seleccionadas.

3. Material y métodos

3.1 Toma de muestras

Los trabajos de cría de reinas seleccionadas y de obtención de zánganos se realizaron en los años 2018 y 2019, durante los meses de marzo y abril. Los zánganos muestreados procedían de dos colmenares: un apiario experimental situado en Aniés (Huesca) (42°18'01.5"N, 0°34'19.1"W) que cuenta con 30 colmenas de la subespecie *Apis mellifera iberiensis* y cuya genealogía es conocida; y otro apiario que colabora en el programa de mejora genética llevado a cabo, y que se localiza en Nueno (Huesca) (42°16'03.4"N, 0°27'22.1"W).

Durante el muestreo, y para evitar una posible deriva de zánganos entre colmenas, se extrajeron directamente los zánganos en estadio de pupa del cuadro de puesta y se transfirieron a tubos de plástico de 50 mL, debidamente etiquetados, con etanol absoluto (Figura 11). Los tubos con las muestras se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. De cada colmena seleccionada se tomaron al menos diez pupas de zánganos.



Figura 11. Toma de muestras de larvas de zánganos en cuadros de puesta.

Para el presente estudio se trabajó en total con 18 colmenas cuya abeja reina había sido seleccionada: en el año 2018 se muestrearon 8 colmenas, 7 de la primera generación del estudio (Y-5, Y-6, Y-10, Y-11, Y-13, Y-19 e Y-25) y una hija de la reina Y-11 (Y-4). En el año 2019 se muestrearon 10 colmenas de las cuales 8 procedían del colmenar situado en Aniés (Y-3, Y-22, Y-26, Y-27, Y-35, Y-38, Y-39 e Y-40) y 2 del

colmenar de Nueno (AB-346 y AB-359). El esquema de selección realizado se muestra en la Figura 12, en el que podemos ver como en la línea de la reina Y-11 se han llevado a cabo dos ciclos de selección, y en la Y-13 solamente uno.

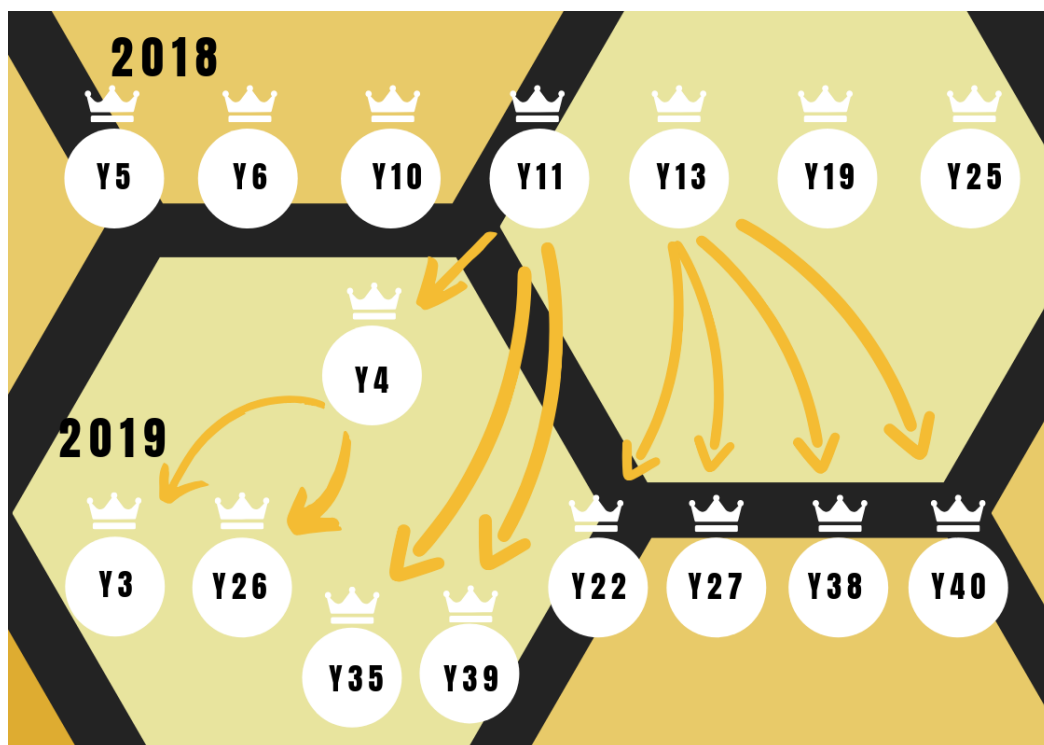


Figura 12. Esquema de selección de reinas de *Apis mellifera iberiensis* realizado en un apiario localizado en Aniés (Huesca) durante los años 2018 v 2019.

3.2 Aislamiento de ADN de zánganos de *A. mellifera iberiensis*

Con el fin de obtener ADN de suficiente cantidad y calidad de las muestras de zánganos, se probaron dos protocolos estandarizados usados habitualmente para la extracción de ADN de insectos como las abejas melíferas: el método de Chelex® (Walsh *et al.*, 1991), que ya se había empleado con éxito en el laboratorio para obtener ADN de patas de abejas obreras, y un método de extracción de ADN basado en un tampón con CTAB (Evans *et al.*, 2013).

Los zánganos inmaduros conservados en etanol se extrajeron de los tubos (mínimo de 6 pupas de cada reina), con unas pinzas esterilizadas, y de ellos se seccionaron dos patas, el tórax o el abdomen. Este proceso se realizó esterilizando el instrumental entre muestras con ayuda de un mechero de alcohol para evitar contaminaciones. Los tubos con las muestras de tejido se colocaron en estufa a 37°C

durante 20-30 min para evaporar completamente el etanol, antes de iniciar la extracción del ADN.

Cuando se siguió el protocolo de Wash *et al.* (1991) a las muestras dispuestas en tubos de 0,2 mL se les añadieron 100 µL de una disolución de Chelex® (Bio-rad) al 5% y 5 µL de la enzima proteinasa K (20 mg/mL, Norgen Technologies, Canadá). Los tubos sellados se agitaron 10 s en vórtex y seguidamente se centrifugaron (30 s a 10.000 rpm) para reunir la mezcla. Los tubos se introdujeron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, EEUU) con el siguiente programa de extracción:

- Incubación de la placa durante 60 minutos a 55°C.
- Inactivación de la enzima proteinasa K durante 15 minutos a 99°C.
- Mantenimiento de la placa un minuto a 37°C.
- Desnaturalización durante 15 minutos a 99°C.

Tras la finalización del programa de extracción, los tubos se centrifugaron a 3.000 rpm x 1 min y las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis.

Cuando se empleó el método de aislamiento de ADN descrito por Evans *et al.* (2013), las muestras de tórax o de abdomen de zánganos inmaduros fueron trituradas con ayuda de un homogenizador estéril y a cada tubo de 1,5 mL se le añadieron 500 µL de un tampón CTAB (100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA, 2% CTAB) y 3 µL de proteinasa K. A continuación, los tubos se agitaron 10 s en el vórtex y se incubaron a 60°C durante 4 h. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min (10°C) y se transfirió el líquido sobrenadante a un tubo nuevo. A cada muestra se le añadió 1V de una disolución de fenol:cloroformo:alcohol isomílico (25:24:1). Se mezclaron las fases mediante volteo y se mantuvieron durante al menos 2 min a 4°C. A continuación, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 10 min (10°C) y se rescató la fase superior en un tubo nuevo. Se repitió entonces la extracción con 1V de cloroformo:alcohol isomílico (24:1). Se voltearon los tubos varias veces y se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm (10°C). Se rescató la fase superior de cada tubo y se transfirió a un nuevo tubo, al que se le añadieron 50 µL de acetato de sodio 3M y 500 µL de isopropanol frío, se agitaron todos los tubos en el vórtex durante 10 s y se incubaron a 4°C durante al menos 30 min. Las muestras se centrifugaron entonces a 13.000 rpm durante 30 min (4°C) y se desechó el líquido. Se lavó el pellet de ADN con 1 mL de etanol frío al 75% y se volvieron a centrifugar los tubos a 13.000 rpm durante 3 min (4°C) descartando nuevamente el líquido. Se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente durante al menos 10 min y se resuspendió el ADN en 50 µL de H₂O ultrapura. A cada muestra se le añadieron finalmente 3 µL de ARNasa (Norgen), y se incubaron a

36°C durante media hora en un termobloque. Las muestras así obtenidas se conservaron a -20°C hasta su empleo.

Tras finalizar el protocolo de extracción, se cuantificó la cantidad y la calidad del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Las muestras extraídas con el protocolo CTAB también se verificaron en geles de TBE (89 mM Tris-borato, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8) y agarosa al 1 %, que tras la electroforesis se tiñeron con bromuro de etidio para posteriormente visualizar los ácidos nucleicos con luz UV. En cada pocillo del gel se cargó una alícuota de 3 µl de la muestra de ADN.

3.3 Amplificación por PCR del marcador del gen *csd*

La amplificación del marcador del locus *csd* se llevó a cabo según el método descrito por Hynk *et al.* (2013), que su vez se basa en el protocolo de PCR diseñado por Hasselmann *et al.* (2001), quienes establecieron las condiciones para la amplificación por PCR de la región terminal del gen, empleando dos pares de cebadores que abarcan unos 550-600 pb: el par genoRfw (5'- AGACRATATGAAAAATTACACAATGA-3'); Cons_{csd}rev (5' TCATCTCATWTTTCATTATTCAAT-3') y el par S-39 (5'-TATAATGAAAAAGAAAAATTTTAGAAG-3'); S-40 (5'-ACTATGTGCATCAATATAAATTC-3') (Hasselmann *et al.* 2010).

Para cada reacción de PCR se utilizaron 0,2 µM de cada cebador, 200 mM de dNTPs, 0,5 U de KapaTaq Taq Polimerasa (KapaBiosystems, Boston, EEUU) y 4 µl de la disolución que contenía el ADN, en un volumen final de 50 µl. Las PCRs se realizaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 o bien el termociclador C1000™ Thermal Cycler (BioRad, EEUU) con el siguiente programa de amplificación:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min.
- 36 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 48°C, 30 s a 60°C y 60 s a 65°C.
- Extensión final de 5 min a 65°C.

Los productos de la amplificación se examinaron en geles de TBE y agarosa al 1 %, que tras la electroforesis se tiñeron con bromuro de etidio para posteriormente ser visualizados con luz UV junto con un marcador de pesos moleculares (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, EEUU). En cada pocillo del gel se cargó una alícuota de 3 µl del producto de la PCR.

3.4 Secuenciación y análisis de las secuencias amplificadas

Tras comprobar en el gel de agarosa que la amplificación había sido correcta, los productos de la PCR se enviaron a secuenciar a una empresa externa (Secugen S.L., Madrid, España) con los cebadores S39 (*forward*) y S40 (*reverse*).

Los electroferogramas obtenidos en la secuenciación se analizaron mediante el software Geneious R8 (Geneious® 8.0.3, Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda, Kearse *et al.*, 2014). En primer lugar, se depuraron los extremos de las secuencias y se obtuvo la secuencia del fragmento correspondiente a cada zángano a partir del alineamiento de las secuencias complementarias. Para cada reina, se clasificaron las secuencias idénticas de sus zánganos en dos grupos correspondientes a los dos alelos sexuales de cada una (denominados aleatoriamente A y B), y se generaron las secuencias consenso. Dichas secuencias se alinearon mediante el algoritmo ClustalW y se cotejaron con las disponibles en las bases de datos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para determinar la o las secuencia(s) de mayor similitud.

Para estudiar las relaciones entre las secuencias obtenidas de los alelos de las 7 reinas inicialmente seleccionadas se obtuvo un dendrograma UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) a partir de las distancias de Tamura-Nei, empleando un bootstrap de 100 repeticiones. Estas secuencias se compararon también con las disponibles en las bases de datos correspondientes a diferentes subespecies de *Apis mellifera* (120 accesiones), realizando un segundo dendrograma UPGMA.

Las secuencias de las regiones exónicas 7 y 8 se identificaron en la secuencia del gen *csd* disponible en el NCBI mediante la herramienta *splign* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>). Una vez mapeadas estas regiones en los alelos obtenidos de *A. m. iberiensis*, se realizó la traducción de las mismas y los correspondientes alineamientos de las secuencias aminoacídicas.

Las secuencias de los alelos de las 10 abejas reinas seleccionadas a partir de las madres de 2018 fueron alineadas con las de los alelos maternos para verificar la genealogía. Todas las secuencias de las familias seleccionadas se compararon para evaluar la conveniencia de los posibles cruzamientos.

4. Resultados y discusión

4.1 Optimización del protocolo de extracción de ADN y amplificación por PCR del gen *csd*

Las muestras de zánganos inmaduros (en estado de pupa) recogidas en el año 2018 se emplearon para extraer ADN mediante un método basado en la utilización de la resina quelante Chelex®, inicialmente a partir de patas, siguiendo el protocolo ya empleado en el laboratorio para aislar ADN de abejas obreras. Sin embargo, no se logró aislar suficiente ADN de las patas de zánganos y, por ello, se ensayó el mismo protocolo empleando el tórax. Las muestras así obtenidas permitieron amplificar el fragmento esperado del gen *csd*, pero fue necesario emplear los dos pares de cebadores GRF/CCR y S39/S40 en la misma reacción. Además, probablemente debido a la mayor complejidad de los tejidos del tórax, el extracto de ADN en la disolución de Chelex no permitió obtener el marcador amplificado a partir de todas las muestras, y finalmente, los productos que se mandaron a secuenciar proporcionaron cromatogramas de baja calidad, por lo que se decidió cambiar de método de extracción de ADN.

Las muestras de ADN de zánganos de las reinas analizadas en 2019 fueron obtenidas por tanto siguiendo un método estandarizado basado en un tampón con CTAB (Evans *et al.*, 2013), para el que se utilizó el tórax de la pupa del zángano. Este método permitió también obtener muestras de ADN de suficiente calidad a partir del abdomen (Figura 13), por lo que se pudieron recuperar muestras de pupas recogidas en 2018 de las que se había tomado su tórax para extraer ADN usando Chelex, y cuya amplificación había fallado o había dado lugar a cromatogramas pobres en su secuenciación.

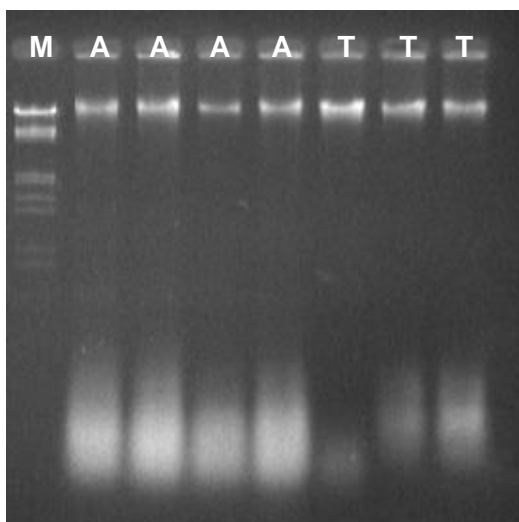


Figura 13. Electroforesis de 7 muestras de ADN de tórax (T) y abdomen (A) de zánganos de *Apis mellifera iberiensis* obtenidas mediante el protocolo CTAB. M, marcador de pesos moleculares λ DNA HindIII/EcoRI.

En las muestras de ADN obtenidas a partir de tórax de zánganos se obtuvo una concentración promedio, de 93 muestras, de 2.272 ± 395 ng/ μ L, mientras que en las muestras obtenidas a partir de abdomen la concentración promedio, de 26 muestras, fue de 1.821 ± 756 ng/ μ L. En algunas de estas muestras de abdomen se determinaron ratios de absorbancia a 260/280 nm bajos (del orden de 0,9), pero incluso en estos casos la calidad del ADN permitió la amplificación de un fragmento del gen *csd* mediante el par de cebadores GRF/CCR o mediante el par S39/S40 (Figura 14).

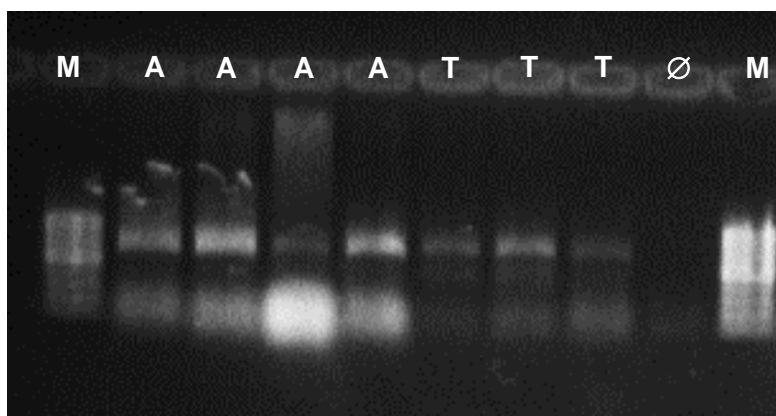


Figura 14. Electroforesis de 7 productos de la amplificación del gen *csd* a partir de muestras de ADN de abdomen (A) y de tórax (T) de zánganos de *Apis mellifera iberiensis*. M, marcador de pesos moleculares; Ø, muestra de control negativo (sin ADN).

4.2 Secuenciación de las reinas de la primera generación.

La secuenciación de los productos de la amplificación del marcador del gen *csd* en 6 zánganos de cada abeja reina seleccionada en 2018 permitió caracterizar el genotipo de las siete para sus alelos sexuales (Tabla 1, Anexo I). En este grupo, sin embargo, únicamente se encontraron 13 alelos diferentes, ya que en el alineamiento y cuando se construyó el árbol UPGMA, se comprobó que dos de las reinas, Y-5 e Y-25, compartían un alelo para este locus (Figura 15). Las 13 secuencias obtenidas presentaron elevados porcentajes de similitud (Tabla 1) con otras del gen *csd* disponibles en la base de datos *Nucleotide* del NCBI, en la que existen 675 accesiones con variantes genómicas de distintas subespecies de *Apis mellifera*, aunque de acuerdo a su descriptor ninguna de ellas corresponde a la subespecie *A. m. iberiensis*. Los alelos de la abeja reina Y13 fueron los que menos similitud mostraron respecto a los descritos en otros estudios.

Tabla 1. Resultados del BLAST para los 14 alelos del gen *csd* de las 7 reinas seleccionadas en un apiario de *Apis mellifera iberiensis* en 2018.

REINA	ALELO	LONGITUD (pb)	ACCESIÓN	GRADO DESIMILITUD (%)	SUBESPECIE DE <i>APIS MELLIFERA</i>
Y5	A	564	JX915864	97,6	<i>A. m. ligustica</i>
			KY502226		
	B	589	KY502205	98,5	<i>A. m. ligustica</i>
Y6	A	397	HQ915837	98,1	<i>A. m. carnica</i>
			HQ915836		
			HQ915827		<i>A. m. caucasica</i>
			HQ915792		<i>A. mellifera</i> sp.
	B	480	HM588917	96,3	<i>A. mellifera</i> sp.
Y10	A	526	KY502226	97,7	<i>A. m. ligustica</i>
	B	658	DQ325103	98,7	<i>A. mellifera</i> sp.
Y11	A	655	DQ325076	99,0	<i>A. mellifera</i> sp.
	B	649	HQ915847	97,2	<i>A. m. carnica</i>
Y13	A	680	DQ325084	91,4	<i>A. mellifera</i> sp.
			HM588927		<i>A. mellifera</i> sp.
	B	655	HQ915818	93,0	<i>A. m. ligustica</i>
Y19	A	489	KY502224	98,3	<i>A. m. ligustica</i>
			KM199790		
	B	623	JX915852	98,9	<i>A. m. ligustica</i>
Y25	A	552	KY502205	98,8	<i>A. m. ligustica</i>
	B	527	JX915854	99,9	<i>A. m. ligustica</i>

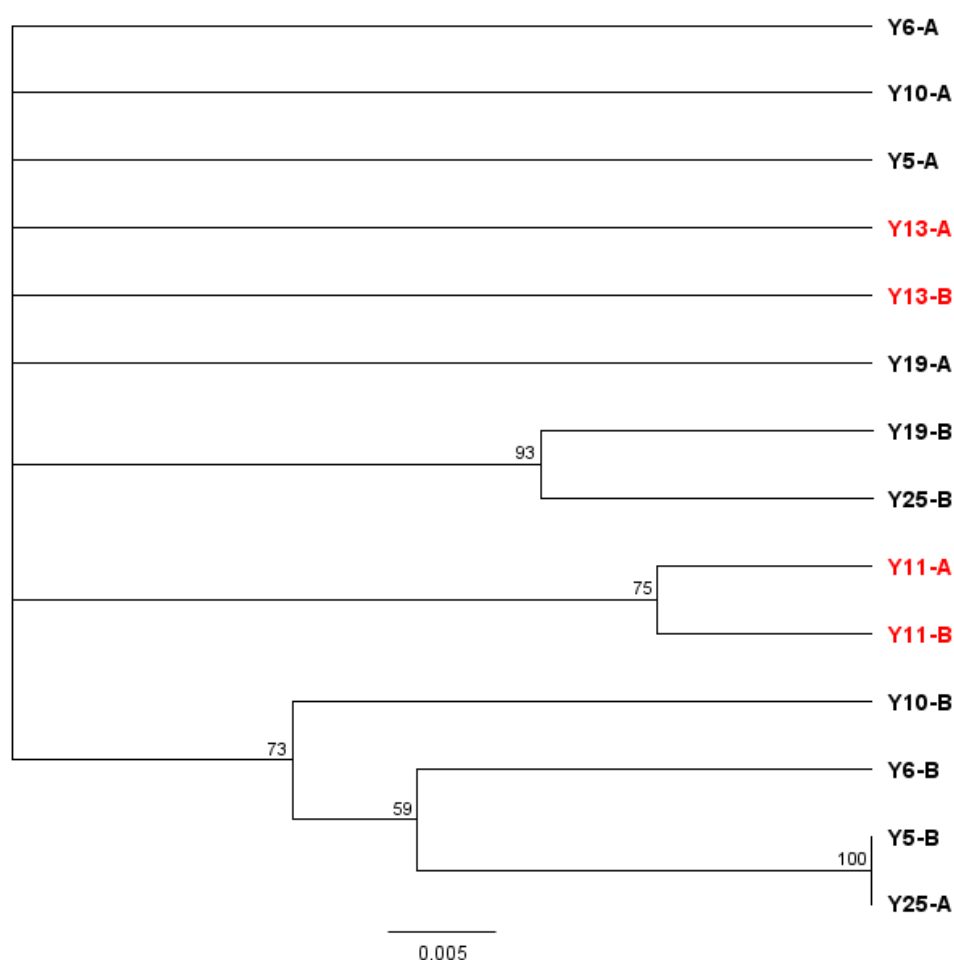


Figura 15. Dendrograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 14 alelos *csd* de 7 abejas reinas de *Apis mellifera iberiensis* seleccionadas en 2018. En rojo aparecen los alelos de las 2 reinas seleccionadas para continuar con el programa de mejora.

El hecho de que los alelos obtenidos de las 7 reinas estudiadas pertenecientes a la subespecie *Apis mellifera iberiensis* sean similares a las secuencias de alelos sexuales de otras subespecies de *Apis mellifera* coincide con los hallazgos realizados por Wang *et al.* (2012), quienes refirieron que los haplotipos *csd* determinados en abejas de seis subespecies de *Apis mellifera* no se agruparon de acuerdo a su origen, aunque existió una diferenciación significativa entre ellas. Esto mismo se puede comprobar con las secuencias de los alelos obtenidos alineándolas con las 120 secuencias disponibles en las bases de datos del NCBI en las que se describe la subespecie a la que corresponde la accesión y que tienen una longitud similar al fragmento amplificado en nuestro estudio (de 600 a 900 pb). Como se aprecia en la Figura 16, los 13 alelos obtenidos de *A. m. iberiensis* se entremezclan con los descritos para otras 6 subespecies de *Apis mellifera*: *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*, *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucásica* y *A. m.*

anatoliaca. Las secuencias de *A. m. iberiensis*, por lo tanto, no constituyen un cluster diferenciado, aunque algunas de ellas sí aparecen agrupadas.

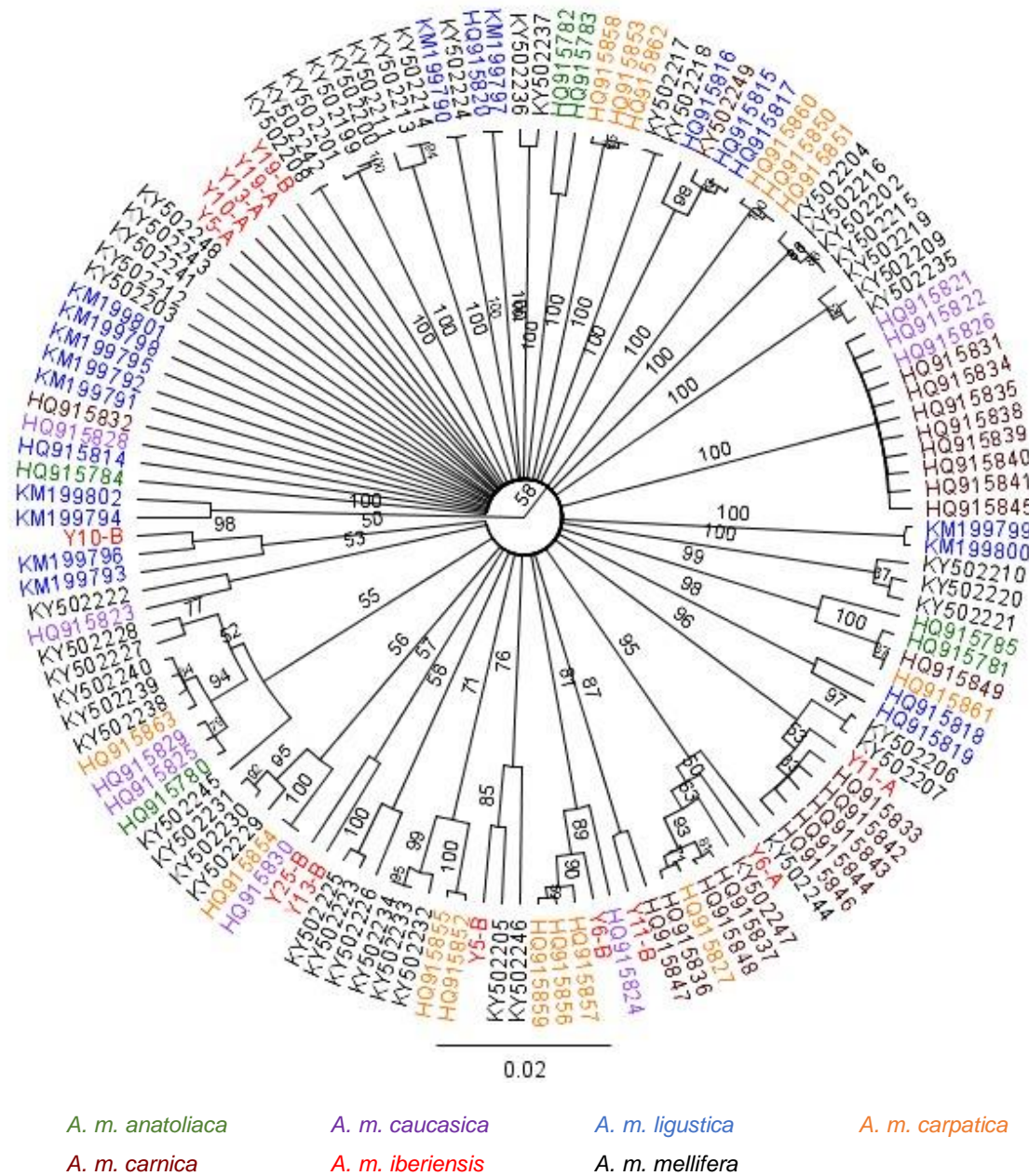
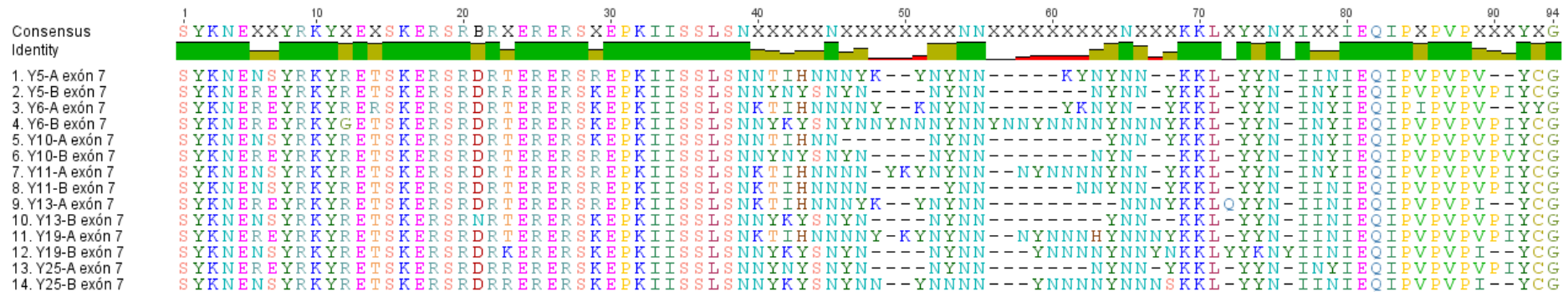


Figura 16. Dendrograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre 133 secuencias parciales del gen *csd* de distintas subespecies de *Apis mellifera*: 48 secuencias de *A. m. mellifera*, 22 de *A. m. carnica*, 20 de *A. m. ligustica*, 10 de *A. m. caucasica*, 14 de *A. m. carpatica*, 6 de *A. m. anatoliaca* y 13 de *A. m. iberiensis*.

Las secuencias de los 13 alelos *csd* de *A. m. iberiensis* presentaron por lo tanto numerosas diferencias, pero es preciso verificar si los cambios detectados afectan a las proteínas que codifican. Los fragmentos secuenciados contienen los exones 7 y 8, los cuales pudieron identificarse y traducirse, aunque en aquellos alelos en los que las secuencias obtenidas eran de menor longitud, el exón 8 no se pudo completar o incluso no se determinó (Y6-A). Cuando se alinearon las secuencias de aminoácidos obtenidas, se encontraron las esperadas diferencias en el número de repeticiones de los residuos NY en la HVR y también diferente número de sustituciones entre los dos alelos de cada reina. En el exón 7 (Figura 17A), por ejemplo, los dos alelos de la abeja reina Y11 se diferenciaron en 10 posiciones, mientras que entre alelos de la Y13 se encontraron 19 diferencias. En concreto la longitud de la HVR (residuos 40-79) fue de 34 aas en el alelo Y11-A y de 26 en el Y11-B, mientras que en Y13-A la secuencia determinada fue de 28 aas y en Y13B de 24 aas. En el exón 8 (Figura 17B) se detectaron 5 sustituciones entre los alelos de Y11 y solo una entre los alelos de Y13. Las diferencias observadas entre cada par de alelos en el exón 7 permiten estimar que se trata de alelos funcionalmente distintos, lo cual coincide con la ausencia de pollo lagunar en las 7 colmenas. Cuando se consideraron los 13 alelos distintos en conjunto, el número de diferencias en el exón 7 varió entre 5 (entre los alelos Y5-B e Y10-B) y 27 (entre Y5-A e Y6-B), En el exón 8 los alelos Y5-B e Y10-B se diferenciaron en 3 sustituciones, por lo que estas diferencias moleculares permiten considerar los 13 alelos como funcionalmente diferentes, de acuerdo a los criterios descritos por Lechner *et al.* (2013). La región que comprende los exones 6-9 del gen *csd* presenta elevadas tasas de cambio, tanto mutaciones sinónimas (no implican cambio de aminoácido) como no sinónimas (Hasselman y Beye, 2004; Cho *et al.*, 2006). El gen en conjunto muestra un nivel de polimorfismo 5-10 veces superior al de regiones neutrales (no adaptativas), y los nuevos alelos funcionalmente distintos, que surgen cuando se acumulan mutaciones a partir de alelos inicialmente equivalentes, experimentan selección positiva.

A



B

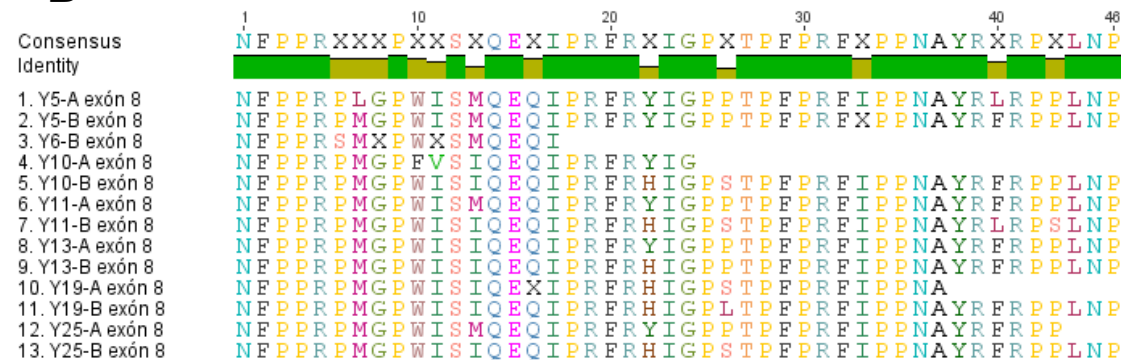


Figura 17. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos correspondientes al exón 7(A) y al 8 (B) de los alelos *csd* de 7 reinas de *A. m. iberiensis* de la primera generación de selección.

4.3 Secuenciación de las líneas seleccionadas

En base al buen comportamiento de sus colmenas en las campañas de 2017 y 2018 (alta producción de miel, mansedumbre, poca tendencia a la enjambrazón, etc.), para continuar el programa de mejora se seleccionaron únicamente 2 reinas de las 7 iniciales, Y11 (nacida en 2016) y la Y13 (nacida en 2017 y procedente del colmenar de Nueno), para las cuales se realizó el proceso de cría de reinas. Varias reinas de las dos líneas se introdujeron en nuevas colmenas: la Y4 de la línea Y11 en la primavera de 2018 y las demás en verano de 2018.

4.3.1 Línea de mejora de la reina Y11

En la primavera del año 2018, como se ha mencionado, a partir de la reina Y11, se obtuvo la reina Y4 mediante división simple de la colmena. En el verano de 2018, se hizo una cría de reinas a partir de Y11, ya que esta reina se mantenía en la colmena con buen comportamiento tras el invierno, y se obtuvieron dos nuevas reinas, la Y35 y la Y39. Estas tres nuevas reinas constituyen el primer ciclo de selección de la línea de la reina Y11. En verano de 2018, también se realizó cría de reinas a partir de Y4, obteniéndose las reinas Y3 e Y26, que se corresponden con el segundo ciclo de selección de la línea Y11.

Se obtuvieron entonces las secuencias de los alelos *csd* de estas 5 reinas (Y4, Y35, Y39, Y3 e Y26) excepto uno de la reina Y26 debido a problemas en la secuenciación de los alelos de dos zánganos. Las 9 secuencias disponibles (Anexos II y III) se compararon con las de los alelos de la reina Y11 mediante un árbol UPGMA a partir de las distancias de Tamura-Nei (Figura 18). También se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes al exón 7 (Figura 19A) y, de forma incompleta en algunos casos, al exón 8 (Figura 19B), ambos extraídos de los dos alelos de cada reina procedente de cría artificial y en relación a los alelos maternos, para determinar cuál había heredado la progenie.

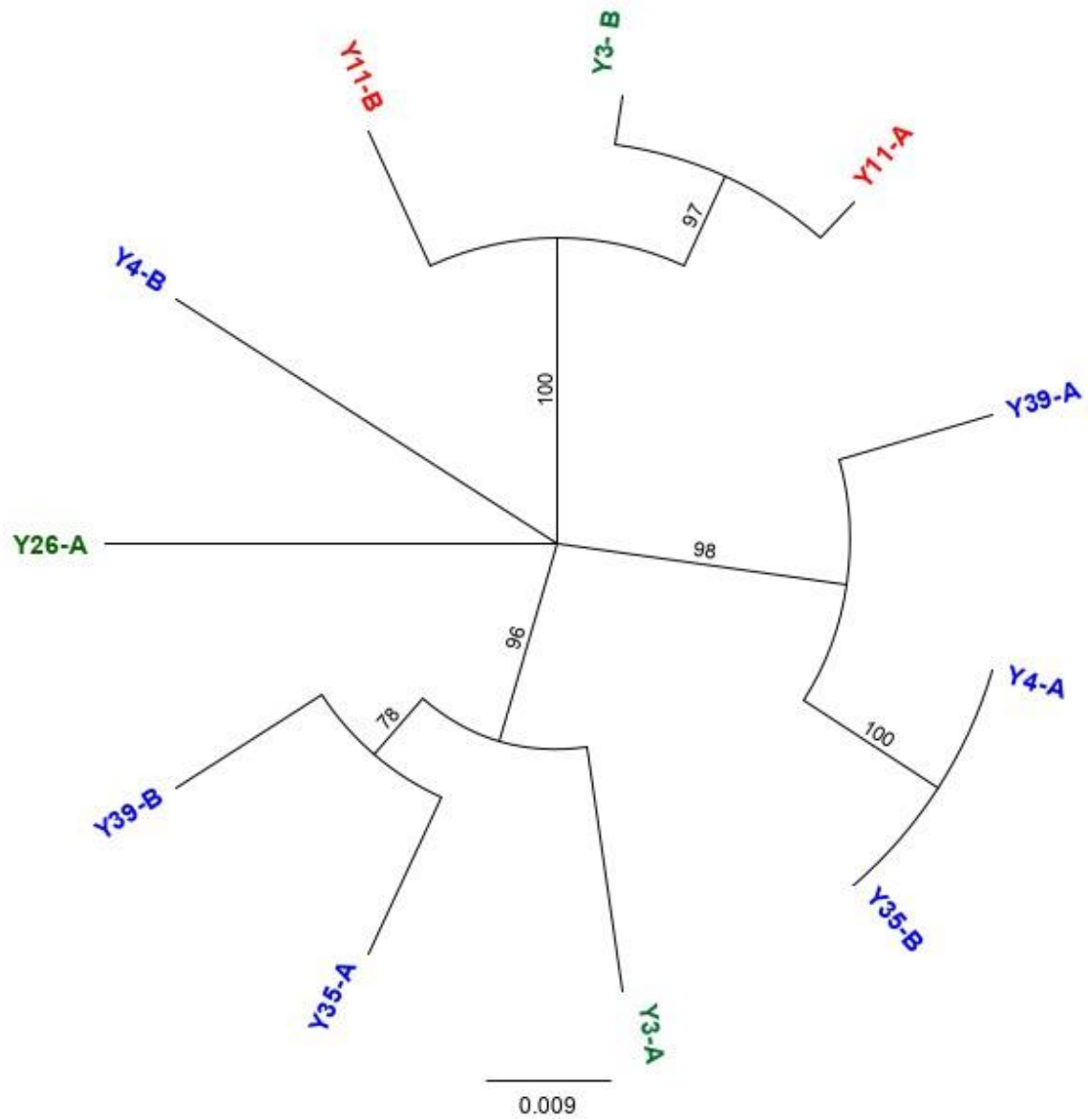
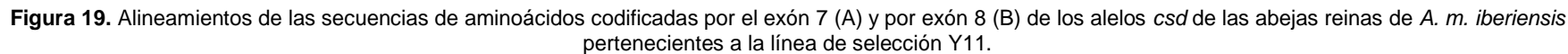


Figura 18. Dendrograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 11 alelos *csd* de las 6 abejas reinas de *Apis mellifera iberiensis* pertenecientes a la línea de mejora de la reina Y11. En rojo aparecen los alelos de esta reina, en azul los alelos pertenecientes a las reinas del primer ciclo de selección y en verde los alelos de las reinas del segundo ciclo de selección.



En el alineamiento, nuevamente la mayoría de los cambios aparecen en las secuencias de aminoácidos codificadas por el exón 7 (Figura 19A) que muestra tanto cambios en la longitud de la HVR como sustituciones de algunos aminoácidos. Al comparar las secuencias aminoacídicas codificadas por los dos alelos de cada reina se puede comprobar cómo entre ambas presentan claras diferencias, lo que concuerda con las observaciones de ausencia de fallos de puesta en la colmena para estos pares de alelos funcionalmente distintos. En el conjunto de los 11 alelos comparados existen un total de 10 alelos diferentes, ya que los alelos Y4-A e Y35-B son idénticos. Sin embargo, no se encontró coincidencia con los alelos maternos para ninguna de las reinas estudiadas: en el caso de la reina Y4 (criada en 2018), al alinear sus dos alelos con los dos maternos se obtuvo que las secuencias con mayor similitud fueron Y11-B e Y4-B con un porcentaje de pares de bases idénticas del 93,3% (Anexo IV). Este porcentaje de similitud no es lo suficientemente alto como para que estos dos alelos se puedan considerar idénticos, ya que es similar al grado de similitud existente entre alelos cualesquiera de *Apis mellifera iberiensis*. Los cambios en las secuencias de estos dos alelos afectaban a la proteína codificada, puesto que se observaron 13 cambios en la secuencia aminoácidos del exón 7 (Figura 19A). Esta falta de concordancia entre los alelos *csd* de la línea materna, dado que la recombinación no se da en este locus de *Apis mellifera* para que se mantenga la diferenciación y la especificidad de los alelos (Hasselman y Beye, 2006), indicaría que se ha producido el reemplazo de la reina en la colmena, de forma que Y4 no sería hija de Y11, sino su nieta, y presentaría los alelos *csd* paternos.

La cría de reinas llevada a cabo en verano de 2018 a partir de la reina Y11, permitió obtener Y35 e Y39, abejas cuyos alelos se alinearon con los maternos y nuevamente las mayores similitudes se observaron entre los alelos Y11-B e Y39-A (94,5% pb idénticas, Anexo IV) y entre los alelos Y11-A e Y35-B (93,1%, Anexo IV). Las diferencias en las secuencias de nucleótidos se correspondieron con numerosos cambios entre las secuencias de aminoácidos codificadas por el exón 7 (Figura 19A) y al menos uno en el 8 (Figura 19B). Por lo tanto, se trataría de alelos diferentes y las reinas criadas artificialmente habrían sido reemplazadas por las obreras entre su nacimiento y la toma de muestras de los zánganos, realizada en la primavera siguiente. En el caso de Y4 e Y35, el alelo común sería entonces el paterno.

La falta de concordancia entre los alelos de la línea materna también se observó al alinear los 3 alelos disponibles de las reinas del segundo ciclo de selección, Y3 e Y26, con los de Y4. Se obtuvieron porcentajes de similitud entre los alelos Y4-B e Y3-A del 92% (Anexo IV) y entre los alelos Y4-A e Y26-A con un 93,4% de pares de bases

idénticas (Anexo IV). Nuevamente no hubo concordancia, pero dado que solamente se consiguió amplificar y secuenciar uno de los alelos de la reina Y26, no se puede descartar la genealogía.

4.3.2 Línea de mejora de la reina Y13

La reina Y13 procede de una cría de reinas realizada en el colmenar de Nueno, y fue introducida en una colmena de Aniés en junio de 2017 tras haber sido apareada en su origen. Este intercambio entre colmenares es uno de los métodos que se puede emplear para minimizar la consanguinidad, especialmente en locus sexual, y evitar la pérdida de la viabilidad de la descendencia (Oxley y Oldroy, 2013).

En el verano de 2018 se realizó una cría de reinas a partir de larvas del cuadro de puesta de esta reina, dado que presentaba muy buenas cualidades productivas. Esto dio lugar a cuatro nuevas reinas (Y22, Y27, Y38, Y40) que constituyen el primer ciclo de selección de Y13. Los 8 alelos *csd* correspondientes se obtuvieron y alinearon para comparar sus secuencias con las de los alelos maternos (Anexo V). También se construyó un árbol UPGMA a partir de las distancias de Tamura-Nei entre los alelos de las 5 reinas que constituyen la familia Y13 para establecer las relaciones ellos (Figura 20).

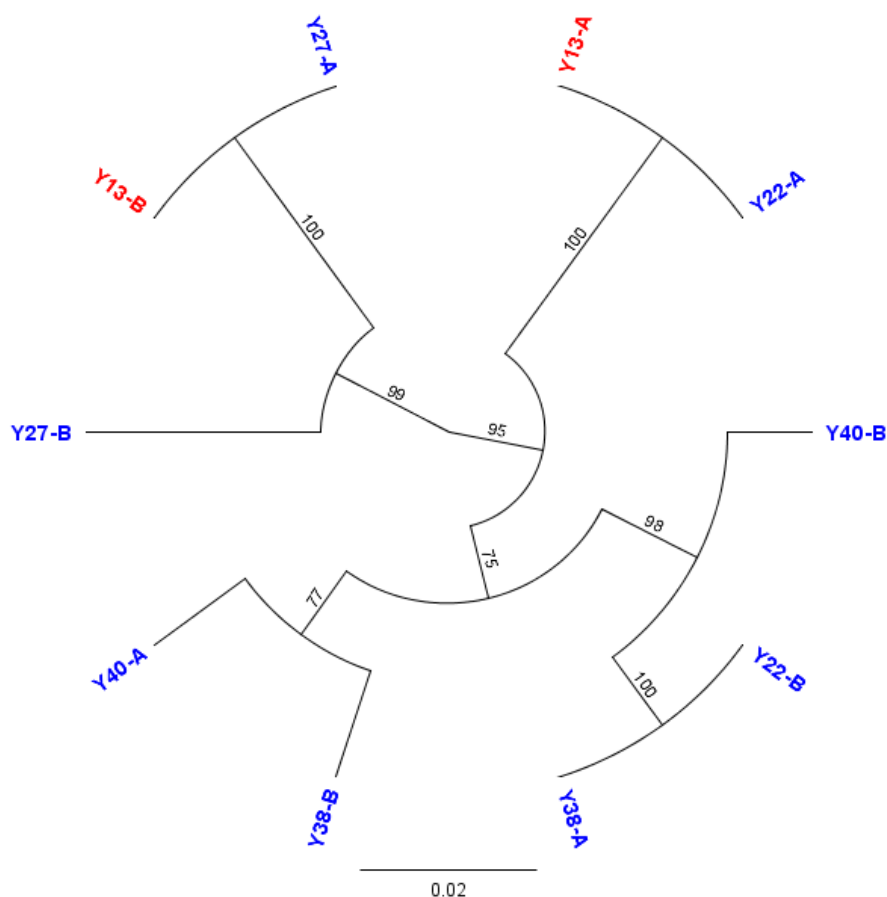


Figura 20. Dendrograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 10 alelos *csd* de las 5 abejas reinas de *Apis mellifera iberiensis* pertenecientes a la línea de mejora de la reina Y13. En rojo aparecen los alelos maternos y en azul los alelos pertenecientes a las reinas del primer ciclo de selección.

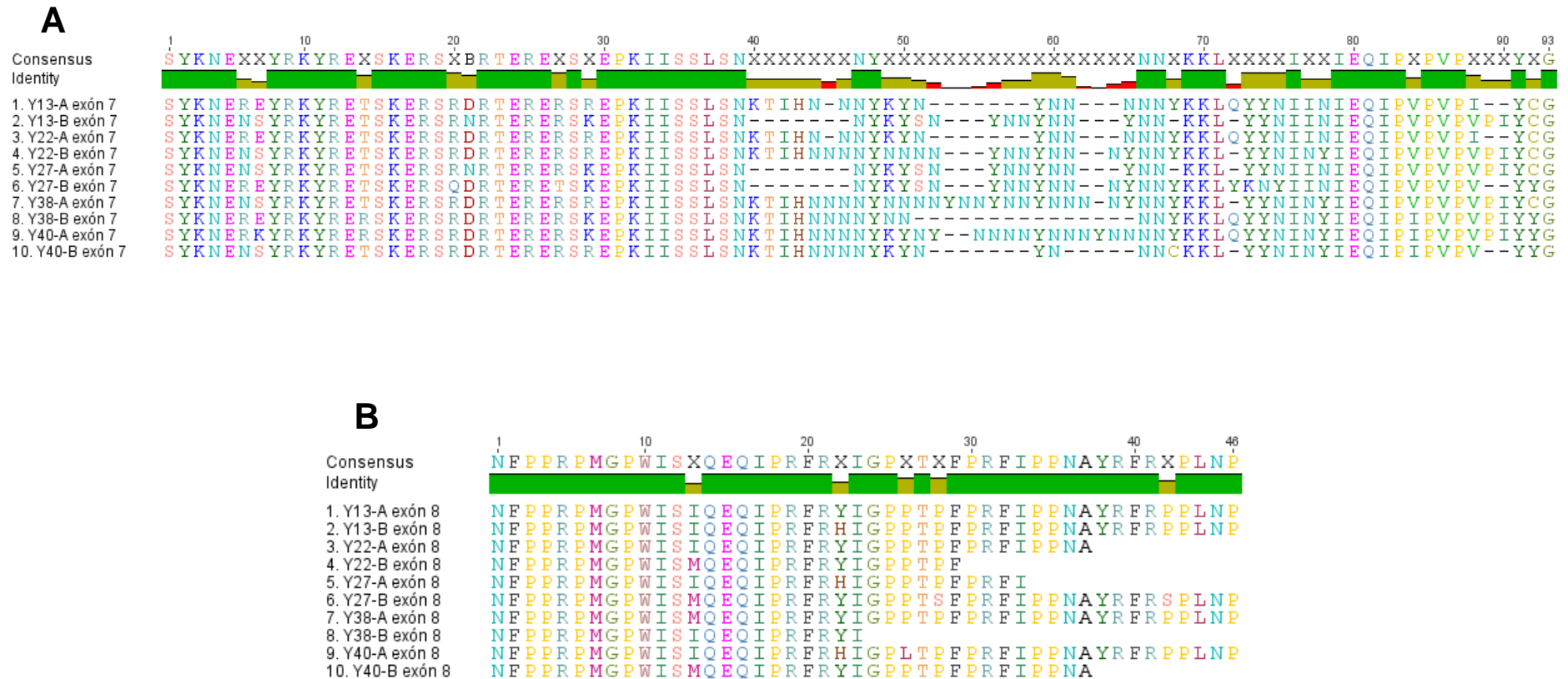


Figura 21. Secuencias de aminoácidos alineadas codificadas por el exón 7 (A) y por exón 8 (B) de los alelos de las abejas reinas de *A. m. iberiensis* pertenecientes a la línea de selección Y13.

En el dendrograma se puede observar la coincidencia entre los alelos Y13-A e Y22-A y entre Y13-B e Y27-A, lo que corrobora la línea materna en estas dos reinas, que han podido ser remplazadas, pero heredaron el alelo materno de *csd*. En contraste, las secuencias de las abejas Y38 e Y40 presentaron diferencias respecto a los alelos de Y13, lo que indicaría que en estas colmenas se produjo el remplazo de la reina procedente de cría artificial. Finalmente, se alinearon las secuencias de aminoácidos correspondientes, tanto del exón 7 (Figura 21A), en el que se observaron la mayoría de los cambios, como 8 (Figura 21B), en el que aparecieron solamente 1 - 3 cambios entre las secuencias. En este alineamiento se encontró además que los alelos Y22-B e Y38-A se diferenciaron únicamente en la longitud de la HVR, y por 4 pb, por lo que funcionalmente se trataría del mismo alelo, lo que indicaría que proceden de la misma línea paterna.

En relación con la reina Y40, fue inseminada con una mezcla de semen de zánganos procedentes de la colmena Y11. Por ello, si se ha producido un remplazo de reina en esta colmena, como indica la falta de concordancia con los alelos maternos de Y13, uno de sus alelos *csd* debería compartirse con uno de Y11. Tras el alineamiento de las secuencias, sin embargo, se observó un porcentaje de pb idénticas del 94,8% entre Y11-B e Y40-B (Anexo VI) y numerosas diferencias entre las secuencias de aminoácidos de ambos alelos (Figura 22), lo que descartaría que se trate del mismo alelo. En esta colmena parece por lo tanto que se ha producido más de un remplazo de reina o que los zánganos procedían de otro origen y se introdujeron en la colmena de cría de zánganos por deriva.

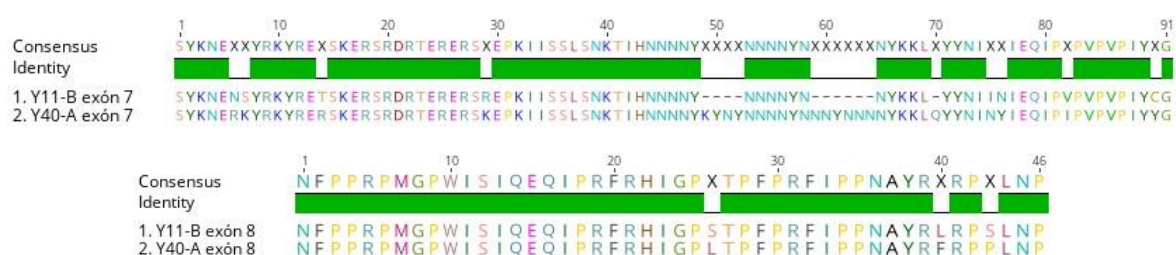


Figura 22. Alineamiento de las proteínas obtenidas de la traducción de los exones 7 y 8 de los alelos Y11-B e Y40-A

Por su parte, la reina Y38 había sido inseminada artificialmente con semen procedente de un zángano de Y11, por lo que también se comprobó el remplazo mediante la herencia del alelo *csd* vía paterna. El mayor porcentaje de bases idénticas se observó en el alineamiento de los alelos Y11-A e Y38-A (97,9%, Anexo VI) y la secuencia de aminoácidos obtenida difirió en 4 pb (Figura 23), por lo que se trataba del mismo alelo.

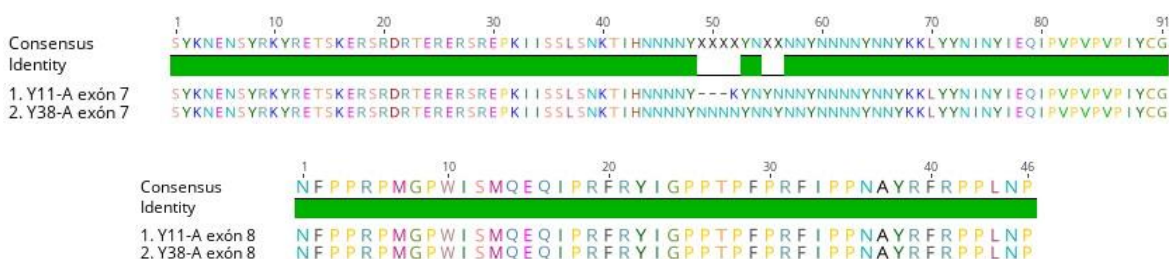


Figura 23. Alineamiento de las proteínas obtenidas de la traducción de los exones 7 y 8 de los alelos Y11-a e Y38-A

Se puede determinar que de las cuatro reinas obtenidas a partir de la reina Y13 en el año 2019, dos de ellas, Y38 e Y40 han sido reemplazadas. Estas dos reinas, al proceder de cría de reinas y de inseminación artificial, tenían mayor probabilidad de ser reemplazadas por las obreras ya que estas tienen a reemplazar más fácilmente a las reinas inseminadas artificialmente. Las otras dos reinas restantes, Y22 e Y27, conservan uno de los alelos de Y13, pero no se puede descartar que no hayan sido reemplazadas.

En base a estos resultados, podría ser conveniente para el desarrollo del programa de mejora acortar los plazos de toma de muestras de pupas de zánganos para verificar que no se ha producido el reemplazo de la reina seleccionada. También se deberían tomar las larvas para la cría artificial a partir de las reinas introducidas en un periodo de tiempo menor. Finalmente, sería recomendable marcar la reina (puede hacerse pintando el tórax o con una etiqueta) y verificar que sigue en la colmena del traslarve. De esta forma, se estaría siguiendo con una mayor seguridad con la línea genética seleccionada.

4.4 Secuenciación de las reinas procedentes del apiario de Nueno. Línea de mejora AB

En el año 2019 se realizó el muestreo de dos colmenas en el apiario de Nueno en las que se pretendía recoger zánganos para inseminar las abejas reinas seleccionadas en el apiario de Aniés durante la primavera. La colonia AB346 se seleccionó por su especial mansedumbre. A partir del ADN de 6 zánganos de cada abeja reina fue posible obtener 3 de los alelos *csd* pudiéndose caracterizar por completo una de estas reinas, AB359 y solamente un alelo de la reina AB346 (Anexo VII). Las tres secuencias presentaron elevados porcentajes de similitud con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI que se correspondían a accesiones de la subespecie *Apis mellifera carnica* (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del BLAST realizado con los 3 alelos csd de las 2 reinas de la línea de mejora AB seleccionada del apiario de *Apis mellifera iberiensis* localizado en Nueno.

REINA	ALELO	LONGITUD (pb)	ACCESIÓN	GRADO DE FIABILIDAD (%)	SUBESPECIE DE <i>APIS MELLIFERA</i>
AB346	A	703	HQ915843	99,1	<i>A. m. carnica</i>
			HQ915842		
AB359	A	767	HQ915843	93,0	<i>A. m. carnica</i>
	B	478	HQ915836	97,7	<i>A. m. carnica</i>

Al construir el árbol UPGMA a partir de las distancias de Tamura-Nei (Figura 24) y obtener los alineamientos de las secuencias aminoacídicas de lo exones 7 (Figura 25A) y 8 (Figura 25B) se pudo comprobar que los tres alelos eran distintos aunque existe un elevado grado de similitud (90,1%) entre los alelos AB346-A y AB359-B en base a la secuencia disponible (se diferencian en el exón 7 en 3 sustituciones de aminoácidos y en la longitud de la HVR por 9 pb), siendo preciso señalar que no se pudo conseguir la secuencia completa del exón 8 para el alelo AB359-B.

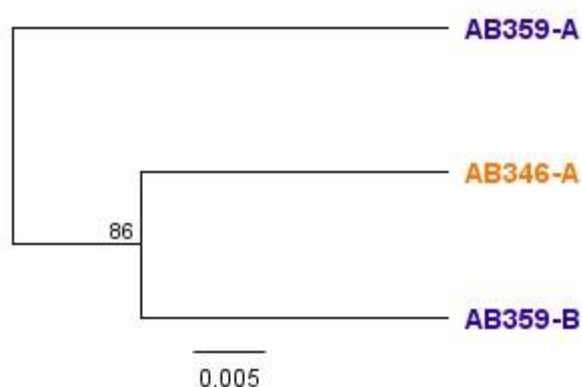


Figura 24. Dendrograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 3 alelos del marcador CSD de las 2 abejas reinas de la subespecie *Apis mellifera iberiensis* pertenecientes a la línea de mejora AB. En naranja los alelos de la reina AB346 y en morado los de AB359.

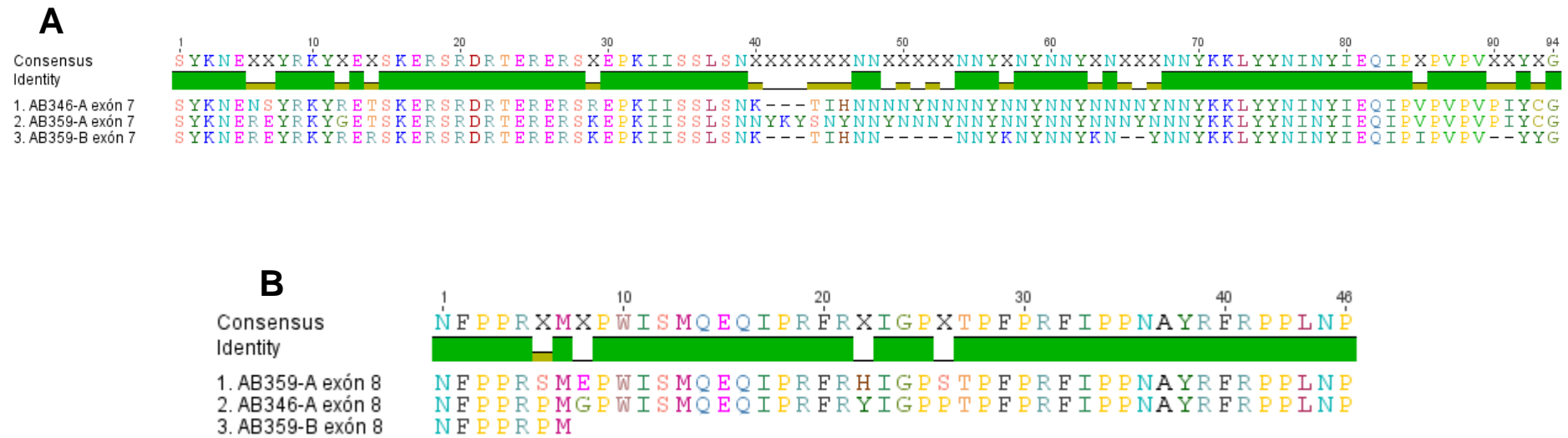


Figura 25. Secuencias de aminoácidos alineadas codificadas por el exón 7 (A) y por exón 8 (B) de los alelos pertenecientes a la línea de selección AB.

En el año 2019 se realizó el cruce entre individuos de la colmena AB346 y AB359 con el objetivo de comenzar una nueva línea de selección. Este cruce, con la información disponible, no se esperaba que presente problemas de pollo lagunar, lo que se verificó posteriormente. Por otra parte, para comprobar si pueden aparecer problemas si se utilizan zánganos de la línea AB en cruces con las abejas reinas criadas en las líneas Y11 e Y13 del apiario de Aniés, particularmente con las progenies de Y13 que inicialmente se seleccionó y fecundó en Nueno, se realizaron los correspondientes alineamientos entre los alelos y se construyó el árbol UPGMA a partir de las distancias de Tamura-Nei (Figura 26).

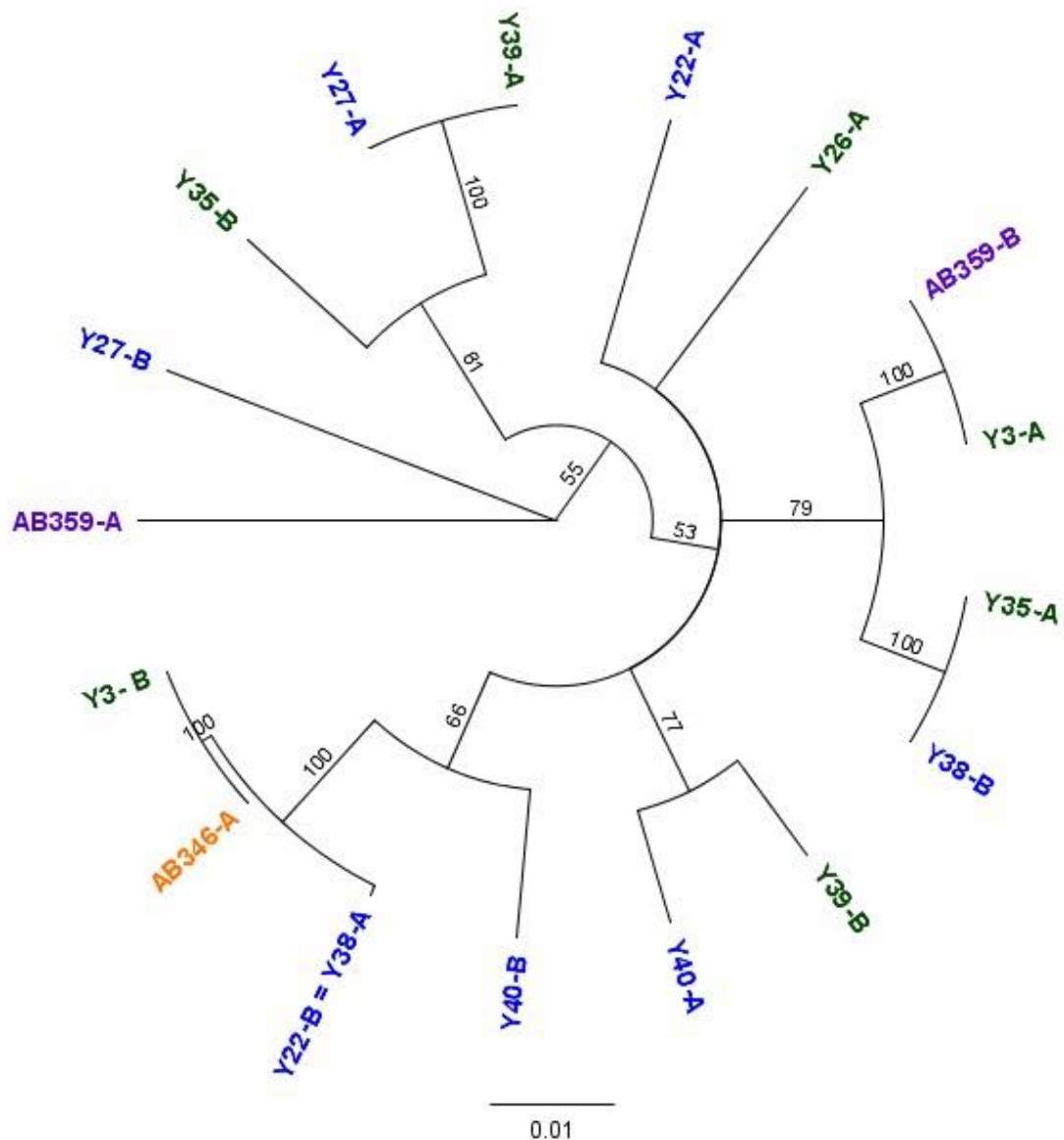
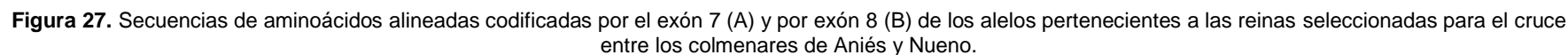


Figura 26. Dendrograma UPGMA derivado de las distancias de Tamura-Nei estimadas entre las secuencias de los 18 alelos *csd* de las 10 abejas reinas de *Apis mellifera iberiensis* pertenecientes a la línea de mejora de las reinas Y11, Y13, AB346 y AB349. En verde aparecen los alelos de las reinas pertenecientes a la línea Y11, en azul los de la línea Y13, en naranja los de la línea AB346 y en morado los de la línea AB359.

El alineamiento de los alelos *csd* de las 10 reinas que constituyen el cruce entre las líneas seleccionadas de Aniés (Y3, Y22, Y26, Y27, Y35, Y38, Y39, Y40) y las de Nueno (AB346, AB359), de los 18 alelos diferentes posibles, se desconoce uno de los alelos que porta Y26 y AB346, solamente 12 son distintos ya que en la reina AB346, su único alelo conocido, coincide con los alelos Y3-B (99,5% pb idénticas, Anexo VIII), Y22-B (97,2%, Anexo VIII) e Y38-A (99,9%, Anexo VIII). También el alelo AB359-A presenta una similitud del 95,6% con el alelo Y3-A. (Anexo VIII). Entre las dos líneas seleccionadas de Aniés también aparecen alelos *csd* idénticos entre sí (100% de pb idénticas, Anexo VIII): Y39-A es el mismo alelo que Y27-A y el alelo Y35-A es el mismo que Y38-B. Al alinear las secuencias de los aminoácidos codificados por los exones 7 (Figura 27A) y 8 (Figura 27B) de estos 12 alelos *csd* diferentes entre sí, se pudo comprobar que en el exón 7 todas las secuencias de aminoácidos presentan diferencias entre sí tanto de cambios de aminoácidos como de longitud. En las proteínas codificadas por el exón 8 si aparecen coincidencias entre las secuencias de aminoácidos de Y40-A y Y39-B e Y26-A e Y35-B que serían iguales entre las parejas. Sin embargo, como en el exón 7 si presentan más de 6 diferencias de aminoácidos entre ellas, se consideran entonces alelos *csd* diferentes entre sí y funcionales.

Se confirma así que estos 12 alelos *csd* son distintos entre sí tanto molecularmente como funcionalmente. Esto supone una reducción importante la diversidad alélica disponible entre los tres colmenares para la realización de los cruces. Además, también se observa una importante reducción de la variabilidad en las líneas seleccionadas del colmenar de Aniés, pues de los 13 alelos diferentes que presentaban las 7 reinas que conformaban la primera generación de reinas seleccionadas, se ha pasado a 11 alelos de 15 posibles diferentes que podían presentar las 8 reinas seleccionadas en el año 2019 y que pertenecen a las dos líneas de selección desarrolladas.



Una vez conocidos los alelos que son iguales entre sí se pueden establecer los cruces entre estas líneas de abejas seleccionadas. Para la reina AB346, dada la alta similitud de su alelo determinado con uno de los alelos de las reinas Y3, Y22 e Y38, el cruce de reinas o zánganos obtenidos de la reina AB346 con individuos de estas colmenas no sería compatible. Como se desconoce el otro alelo que porta la reina AB346, no es posible establecer más relaciones con el resto de las colmenas, por lo que los cruces con el resto de las reinas de Aniés (Y26, Y27, Y35, Y39, Y40) serían posibles siempre y cuando el alelo AB346-B (sin determinar) no coincida con ninguno de los que portan estas 5 reinas.

Los cruces de la reina AB359 con las reinas de apiario de Aniés los limita el alelo AB359-B que guarda una alta similitud con el alelo Y3-A, por lo que el cruce entre individuos procedentes de estas dos colmenas no sería recomendable. El cruce de zánganos o reinas descendientes de AB359 con el resto de las colmenas de Aniés sí daría lugar a cruces viables, ya que no existe riesgo de homocigosis entre sus alelos *csd*, y por tanto no daría lugar a la aparición de pollo lagunar en los cuadros de puesta.

También se podrían realizar cruces entre las reinas de las líneas Y13 e Y11, de forma que de las 8 reinas disponibles en el año 2019, los cruces poco aconsejables serían los de individuos pertenecientes a las colmenas Y35 con los de la colmena Y38, y los de la Y39 con la Y27, ya que, como se ha comentado anteriormente, las reinas de estas colmenas comparten uno de sus alelos *csd*. El resto de cruces entre las reinas de estas dos líneas sí serían viables.

5. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en este estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El método de extracción de ADN a partir de tórax de zánganos de *Apis mellifera iberiensis* utilizando un tampón CTAB fue más efectivo y reproducible que el método Chelex, dando lugar a muestras que permitieron un mayor número de amplificaciones positivas del fragmento terminal del gen *csd* mediante PCR y a secuenciaciones de mejor calidad.
2. Los alelos *csd* caracterizados en la primera generación de selección presentaron pronunciadas diferencias en las secuencias intrónicas y en las de aminoácidos codificadas por los exones 7 y 8, particularmente en el primero de ellos, como se ha descrito en estudios previos con otras subespecies. Estas diferencias indicaron que se trataba de 13 alelos funcionalmente distintos. Los 7 pares de alelos de cada reina se determinaron como diferentes, lo cual coincide con la observación de ausencia de fallos de puesta en las colmenas.
3. Cuando se comprobó la herencia de los alelos maternos en dos familias de reinas procedentes de cría artificial, no se encontró coincidencia en la mayoría de las estudiadas, excepto en dos, por lo que habían sido remplazadas por las obreras antes del muestreo de zánganos. Esto sugiere que las tasas de reemplazo de las reinas podría ser elevada en *A. m. iberiensis*, lo cual tiene implicaciones prácticas en un programa de mejora de esta subespecie.
4. Tres de los cuatro alelos *csd* de las dos reinas seleccionadas en el apiario de Nueno pudieron caracterizarse, y se comprobó que se trataba de alelos distintos. Sin embargo, se encontraron coincidencias con los alelos obtenidos del apiario de Aniés, por lo que algunos de los cruzamientos entre individuos de estas colmenas no serían aconsejables, puesto que al compartir un alelo sexual podrían aparecer problemas de pollo lagunar.
5. Las 8 reinas seleccionadas en el apiario de Aniés en 2019 comparten algunos alelos *csd*, de forma que en el conjunto de los 15 estudiados se han determinado solo 11 diferentes. Estas coincidencias reducen las posibilidades de cruzamientos entre individuos de las líneas Y.

6. Bibliografía

- Benedetti, L., & Pieralli, L. (1990). Apicultura. Barcelona: Omega.
- Beye M. (2004). The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *Bioessays* 26: 1131-1139.
- Beye M., Hasselmann M., Fondrk M.K., Page R.E., Omholt S.W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114: 419-429.
- Beye M., Seelmann C., Gempe T., Hasselmann M., Vekemans X., Fondrk M.K., Page R.E. (2013). Gradual molecular evolution of a sex determination switch through incomplete penetrance of femaleness. *Current Biology* 23: 2559–2564.
- Büchler, R., Andonov, S., Bienefeld, K., Costa, C., Hatjina, F., & Kezic, N. et al. (2013). Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research* 52: 1-30.
- Cánovas, F., de la Rúa, P., Serrano, J., Galián, J. (2007). Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46: 24-30.
- Cánovas, F., de la Rúa, P., Serrano, J., Galián, J. (2011). Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie* 42: 235-251.
- Chávez-Galarza, J., Henriques, D., Johnston, J., Carneiro, M., Rufino, J., Patton, J., & Pinto, M. (2015). Revisiting the Iberian honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) contact zone: maternal and genome-wide nuclear variations provide support for secondary contact from historical refugia. *Molecular Ecology*, 24(12), 2973-2992. doi: 10.1111/mec.13223
- Cho, S., Huang, Z.-Y., Green, D., Smith, D.R., and Zhang, J., (2006). Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: balancing selection and transpecies polymorphisms. *Genome Research*, 16: 1366-1375
- Cobey, S., Tarpy, D. and Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52: 1-18.
- De la Rúa P.; Jaffé R., Muñoz I.; Serrano J. 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* 40: 263–284

- Ellis, J.D., Evans, J. D., y Pettis, J. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research* 49: 134-136.
- Evans, J., Budge, G.E., Schwarz, R.S., De la Rua, P. (2013). Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* (DOI: 10.3896): 10-12.
- Fao.org. (2019). FAOSTAT. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL/visualize> [Último acceso: 11 Mayo 2019].
- Gempe T., Hasselmann M., Schiøtt M., Hause G., Otte M., Beye M. (2009). Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biol* 7(10): e1000222.
- Hasselmann M., Beye M. (2006). Pronounced differences of recombination activity at the Sex Determination Locus of the honeybee, a locus under strong balancing selection. *Genetics* 174: 1469–1480.
- Hasselmann M., Fondrk M.K., Page R.E. Jr, Beye M. (2001) Fine-scale mapping in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insect Molecular Biology* 10: 605–608.
- Hasselmann M., Lechner S., Schulte C., Beye M. (2010). Origin of a function by tandem gene duplication limits the evolutionary capability of its sister copy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 107: 13378–13383.
- Hasselmann, M., & Beye, M. (2004). Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 4888–4893. doi:10.1073/pnas.0307147101
- Hyink O., Laas F., Dearden P.K. (2013). Genetic tests for alleles of complementary-sex-determiner to support honeybee breeding programmes. *Apidologie* 44: 306–313.
- Jean-Prost, P., & Le, C. Y. (2007). *Apicultura: Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena* (4a. ed.).
- Kaskinova M.D., Nikolenko A.G. (2017). *csd* Gene of Honeybee: Genetic Structure, Functioning, and Evolution. *Russian Journal of Genetics* 53: 297–301.
- Kumar Gupta, R., Glenn, T., Glenn, S. (2014). Genetics and selection of bees: Breeding for healthy and vigorous honeybees (Book Chapter). *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security: Vol. 1: Technological Aspects of Beekeeping* pp. 247-280

- Lechner S., Ferretti L., Schöning C., Kinuthia W., Willemsen D., Hasselmann M. (2013). Nucleotide variability at its limit? Insights into the number and evolutionary dynamics of the sex-determining specificities of the honey bee *Apis mellifera*. *Molecular Biology and Evolution* 31: 272–287.
- López-Urbe, M., Soro, A. and Jha, S. (2017). Conservation genetics of bees: advances in the application of molecular tools to guide bee pollinator conservation. *Conservation Genetics*, 18: 501-506.
- Meixner MD, Costa C, Kryger P, Hatjina F, Bouga M, Ivanova E, Büchler R. 2010. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research* 49: 85-92.
- Meixner, M.D., Pinto, M.A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E., Fuchs, S. (2013). Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. In V Dietemann; J.D. Ellis; P. Neumann (Eds). *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.05>.
- Miguel, I., Baylac, M., Iriondo, M., Manzano, C., Garnery, L., Estonba, A. (2010). Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie* 42: 150-161.
- Nissen I., Müller M., Beye M. (2012). The *Am-tra2* gene is an essential regulator of female splice regulation at two levels of the sex determination hierarchy of the honeybee. *Genetics* 192: 1015–1026.
- Oxley P.R., Oldroyd B.P. 2010. The genetic architecture of honeybee breeding. *Advances in Insect Physiology* 39: 83-118.
- Péntek-Zakar, E., Andrzej, O., Borowik, T., Kusza, S. (2015). Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. *Ecology and Evolution* 5(23): 5456-5467.
- Sepúlveda Gil, J. (1986). *Apicultura*. Barcelona: Aedos.
- Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2018). El sector apícola en cifras. Principales indicadores económicos. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado (NIPO: 013-17-209-4): 1-7
- van Wilgenburg E., Driessen G., Beukeboom L.W. (2006). Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? *Frontiers in Zoology* 3: 1.

- Wallberg A., Han F., Wellhagen G., Dahle B., Kawata M., Haddad N. (2014). A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics* 46, 1081-1090.
- Walsh, P.S, Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513.
- Wang, H., Wang, Z.-L., Zeng, Z.-J., Wu, X.-B., Yan, W.-Y. (2013). Nucleotide diversity based on *csd* gene of the black giant honey bee, *Apis laboriosa* (Hymenoptera: Apidae). *European Journal of Entomology* 110(2), pp. 215-220.
- Wang, Z., Liu, Z., Wu, X., Yan, W., Zeng, Z. (2012) Polymorphism analysis of *csd* gene in six *Apis mellifera* subspecies *Molecular Biology Reports* 39(3), pp. 3067-3071
- Yániz, J., Ángel, E., Martín, P., Sales, E., Santolaria, P. (2016). Caracterización de la abeja melífera en la provincia de Huesca. *Lucas Mallada* 18: 257-271.
- Zareba J., Blazej P., Laszkiewicz A., Sniezewski L., Majkowski M., Janik S., Cebrat M. (2017). Uneven distribution of complementary sex determiner (*csd*) alleles in *Apis mellifera* population. *Scientific Reports* 7: 2317.

ANEXOS

Anexo I. Secuencias alineadas de los alelos obtenidos de las reinas que constituyen la primera generación de selección

	1	10	20	30	40	50	60
Y6-A	-----	-----	-----	-----	AGAAAGAACAAGTCGTAAGCGCTATTCTCGT	-----	-----
Y10-A	TTACACAATGAAAAAGAAAACTTTTAAAGAAAGAACAAGTCGTAACCGTTATTCTCGT						
Y11-A	--TTATAATGAAAAAGAAAAATTTTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTCGT						
Y5-B	-----	-----	-----	-----	TAGAAGAAAGANCGAGTNGTAAGCGCTATTCTCGT	-----	-----
Y25-A	-----	-----	-----	-----	-----	AGTCGTAAGCGCNATTCTCGT	-----
Y19-B	-----	-----	-----	-----	-----	AAGAAAAATTTT	TAGAAGAAAGAACGAGTCGTAAGCGCTATTCTCGT
Y25-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Y5-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Y13-A	-----	-----	-----	-----	-----	GNNCGAGTCGTAAGCGTTATTCTCGT	-----
Y13-B	-----	-----	-----	-----	-----	GAACAAGTCGTAAACGTNATTCTCGT	-----
Y19-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Y11-B	-----	-----	-----	-----	-----	AAGAAAAATTTT	TAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTCGT
Y10-B	-----	-----	-----	-----	-----	CAATGAAAAAGAAAAATTTT	NAGAAGAAAGAACAAGTNGTAAGCGTNATTNCGT
Y6-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Y6-A	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCAGATATATCATA						
Y10-A	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCATA						
Y11-A	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCATA						
Y5-B	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATGT--AATATATCATA						
Y25-A	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATGT--AATATATCATA						
Y19-B	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATCAGAAATATATCAGATATATCATA						
Y25-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AATATATCATA
Y5-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Y13-A	TCAAGAGAACNAGAGCAAAAAGTATGAANCGANATATACGAAATATATCAGATATATCATA						
Y13-B	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGANATATATGAAGTATATNAGATATATCATA						
Y19-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	ATATCATA
Y11-B	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCATA						
Y10-B	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGGAACGANATATATGAAATATATCAGATATATCATA						
Y6-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	GAGAGCAAAAAGTATGAAAAGANNNTNTGAAATATATNAGATATATCATA
Y6-A	TTTATTAAAAATTAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGAG						
Y10-A	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTAATAT--TATTACAGATCATATAAAAAATGAAAATT						
Y11-A	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAATT						
Y5-B	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGTTTCGTATAAAAAATGAAAGAG						
Y25-A	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGTTTCGTATAAAAAATGAAAGAG						
Y19-B	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTTAAT--ATTATTACAGATCATATAAAAAATGAGAATT						
Y25-B	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTTAAT--TTTATTACAGATCATATAAAAAATGAAAATT						
Y5-A	--TGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTTAAT--ATTATTACAGATCGTATAAAAAATGAAAATT						
Y13-A	TNTATTAAANCATTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGAG						
Y13-B	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTTAAT--TTTATTACAGATCATATAAAAAATGAAAATT						
Y19-A	TTTATTAAAAATTTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGAG						
Y11-B	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAATT						
Y10-B	TTTATTAAAAATTTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGAG						
Y6-B	TTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATTAATATTTTATTATAGGTCATATAAAAAATGAAAGAG						
Y6-A	AATATCGAAAAATATCGAGAAAAGATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAGA						
Y10-A	CTTATCGAAAAATATCGAGAAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAAA						
Y11-A	CTTATCGAAAAATATCGAGAAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAGA						
Y5-B	AATATCGAAAAATATCGAGAAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAAGAGAACGAGAGA						
Y25-A	AATATCGAAAAATATCGAGAAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAAGAGAACGAGAGA						
Y19-B	CTTATCGAAAAATATCGAGAAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAAAAGAACGAGAAA						

Y25-B CTTATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAAGAGAACGAGAAA
Y5-A CTTATCGAAAGTATCGAGAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAGA
Y13-A AATATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAGA
Y13-B CTTATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAAATAGAACAGAACGAGAGA
Y19-A AATATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAGA
Y11-B CTTATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAGA
Y10-B AATATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAGA
Y6-B AATATCGAAAAATATGGAGAAACATCGAAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAGA

Y6-A GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAATAAGACAATACATAA-----
Y10-A GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAATAATACAATACATAA-----
Y11-A GATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAA-----
Y5-B GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAATAATTACAATTATAG-----
Y25-A GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAATAATTACAATTATAG-----
Y19-B GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAATTATAAATACAG-----CA
Y25-B GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAATTACAAATATAG-----CA
Y5-A GATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAATACAATACATAA-----TA
Y13-A GATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAA-----TA
Y13-B GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAA--TTATAAATA-----TA
Y19-A GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAATAA---TA
Y11-B GATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAA-----
Y10-B GATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAATAATTACAATTATAG-----
Y6-B GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAATTACAAATATAGCAATTATA

Y6-A -TAATAATAATTATAAA-----AATTATAATAATTATAAA---AATTATA
Y10-A -TAATAAT-----TATAATAATTATAA-----TA
Y11-A -TAATAATAATTATAAATATAATTATAATAATAATTATAATAATAAAT---TATAATA
Y5-B -CAATTATAATAATTATAAT-----AATAAT---TATAA-----TAA--
Y25-A -CAATTATAATAATTATAAT-----AATAAT---TATAA-----TAA--
Y19-B ATTATAATAATTATAATAAT-----TATAATAATAATAAT---TATAA-----TAATT
Y25-B ATTATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAATAATAAT---TATAA-----TAATA
Y5-A ATAATTATAAATATAATTAT-----AATAATAAA---TATAA-----TTATA
Y13-A ATAATTATAAATATAATTAT-----AATAAT---ATAA-----TAATT
Y13-B GCAATTATAA---TAATTAT-----AATAAT---TATAA-----TAA--
Y19-A ATAATTATAAATATAATTATAATAATAATTATAATAATAATCATTATAA-----TAATA
Y11-B -TAATAATAATTATAATAAT-----AATAAT---TATAA-----TAA--
Y10-B -CAATTATAA---TAATTAT-----AATAAT-----AA-----TTA--
Y6-B ATAATTATAATAATAATTATAATAATTATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAATA

Y6-A ATTATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTAATTATATTGAACAAATTCCTATTCCCTG
Y10-A ATTATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y11-A ATTATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y5-B -TTATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y25-A -TTATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y19-B ATAATAAAAAAATTATATTACAAAAATTATATTATTAATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y25-B ATTCTAAAAAATTATATTACAA-----TATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y5-A ATAATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y13-A ATAAAAAATTACAATATTACAA-----TATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y13-B -TAAAAAGTTA---TATTACAA-----TATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y19-A ATTATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y11-B -TTATAAAAAAATTATATTATAA-----TATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y10-B -TAATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG
Y6-B ATTATAAAAAAATTATATTACAA-----TATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTG

Y6-A TTCCTGTT-----TATTATGGGGTGAGTATTTATATCTCATTTA-----
Y10-A TTCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTT
Y11-A TTCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTT
Y5-B TTCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAGAAAATTTCT
Y25-A TTCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAGAAAATTTCT
Y19-B TTCCT-----ATTTATTGTGGGGTGAGTATGTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTT
Y25-B TTCCT-----ATTTATTGTGGGGTGAGTACTTATATCTCAATTATAAAAGAAAATTTT

Y5-A TTCCT-----GTTTATTGTGGGGTGAGTATTCATATCTCAATTATAAAAAGAAAGTTTTT
Y13-A TTCCT-----ATTTATTGTGGGGTAAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTT
Y13-B TTCCTGTTTCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAGAAAGTTTTT
Y19-A TTCCTGTTTCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTT
Y11-B TTCCTGTTTCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATGTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTT
Y10-B TTCCTGTTCCCGTTTATTGTGGGGTAAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTT
Y6-B TTCCTGTTTCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAGAAAATTTCT

Y6-A -----
Y10-A TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTTTGTTC
Y11-A TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y5-B TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y25-A TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y19-B TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAACTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y25-B TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y5-A TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y13-A TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y13-B TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y19-A TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAACTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y11-B TAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y10-B TAACAATATTAAATTTTATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTT
Y6-B TAACAATATTAAATTTTATTATTAGAATTTTCCACCNAGATCAATGNAACCTTGGATNTC

Y6-A -----
Y10-A AATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCC-----
Y11-A AATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATT
Y5-B AATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGATATATTGGTCCACCNACACCATTTCCACGATT
Y25-A AATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGATATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATT
Y19-B AATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATTAACACCATTTCCACGATT
Y25-B AATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCATTTCCACGATT
Y5-A AATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATT
Y13-A AATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATT
Y13-B AATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATT
Y19-A AATACAAGAACNAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCATTTCCACGATT
Y11-B AATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCATTTCCACGATT
Y10-B AATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCGTTTCCACGATT
Y6-B GATGCAAGAACAAATA-----

Y6-A -----
Y10-A -----
Y11-A CATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGNATGTTATGAATTTA
Y5-B CANTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTNAATCCNAGTATGTTATGAATT--
Y25-A CATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTC-----
Y19-B CATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTA
Y25-B CATTCCTCCNAATGCGTACAGATTTTCGTCCACCTCTNAATCCTAGTATGTTATGAATTTA
Y5-A CATTCCTCCAAATGCGTATAGACTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGT-----
Y13-A CATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTA
Y13-B CATTCCTCCAAATGCGTACAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTA
Y19-A CATTCCTCCNAATGCG-----
Y11-B CATTCCTCCAAATGCGTATAGACTTTCGTCCATCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTA
Y10-B CATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTA
Y6-B -----

Y6-A -----
Y10-A -----
Y11-A TATTGATGCACATAG-----
Y5-B -----
Y25-A -----
Y19-B TATTGATGC-----
Y25-B TATTG-----
Y5-A -----

Y13-A	TATTGATGCNCATAGTAGACNATATGAAAAATTACACAATGAATTTATATTGATGCACAT
Y13-B	TATTGATGCACATAGTAGACAATATGAAAAATTACACAATGAATTTATATTGATGCACAN
Y19-A	-----
Y11-B	TATTGATGCACATAGTAGACNATATGAAAAATTACACAATGAAT-----
Y10-B	TATTGATGCACATAGTATTAAATGCTATATTAATTTTTCGTTTTTTTTTTT-----
Y6-B	-----
Y6-A	-----
Y10-A	-----
Y11-A	-----
Y5-B	-----
Y25-A	-----
Y19-B	-----
Y25-B	-----
Y5-A	-----
Y13-A	AGTAGACNNTATGAAAAATTACACAATGAATTTATA
Y13-B	AGNAGACAATATGAAAAATT-----
Y19-A	-----
Y11-B	-----
Y10-B	-----
Y6-B	-----

Anexo II. Secuencias alineadas de los alelos obtenidos en el primer ciclo de selección de la línea de Y11

	1	10	20	30	40	50	60
Y4-A	-----						
Y26-A	ATTACACAATGAAAAAGAAAAACTTTTGTAGAAGAAAGAACGAGTCGTAAGCGCTATTCTCG						
Y3-B	-TTACACAATGAAAAAGAAAAACTTTTGTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTCG						
Y11-A	---TTATAATGAAAAAGAAAAATTTTGTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTCG						
Y35-B	-----AAGAAAAATTTTGTAGAAGAAAGAACAAGTCGTGAGCGTTATTCTCG						
Y39-A	-----AAATTTTGTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAACGTTATTCTCG						
Y35-A	-TTACACAATGAAGAAGAAAAACTTTTGTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGCTATTCTCG						
Y39-B	-----AAAAATTTTGTAGAAGGAAGAACAAGTCGTAAGCGCTATTCTCG						
Y3-A	-----AAAAATTTTGTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGCTATTCTCG						
Y4-B	-----AGAAAAANTNTTGTAGAAGAAAGANCGAGTNGTNAGCGCTATTCTCG						
Y11-B	-----AAGAAAAATTTTGTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTCG						
Y4-A	-----ATATATGAAATATATCAAATATATCAT						
Y26-A	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCAT						
Y3-B	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCAT						
Y11-A	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCAT						
Y35-B	TTCAAGAGAACAAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAAATATATCAT						
Y39-A	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAGTATATGAGATATATCAT						
Y35-A	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCAGATATATCAT						
Y39-B	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCAGATATATCAT						
Y3-A	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCAGATATATCAT						
Y4-B	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATGT--AATATATCAT						
Y11-B	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCAT						
Y4-A	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAT--TTTATTACAGATCATATAAAAAATGAAAAAT						
Y26-A	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAT--ATTATTACAGATCATATAAAAAATGAGAAT						
Y3-B	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAAAT						
Y11-A	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAAAT						
Y35-B	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAT--TTTATTACAGATCATATAAAAAATGAAAAAT						
Y39-A	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAT--TTTATTACAGATCATATAAAAAATGAAAAAT						
Y35-A	ATTTATTAAAAATTAAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGA						
Y39-B	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAT--TTTATTACAGGTCATATAAAAAATGAGAGA						
Y3-A	ATTTATTAAAAATTAAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGA						
Y4-B	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGTTCGTATAAAAAATGAAAGA						
Y11-B	ATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAAAT						
Y4-A	TCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAAGAGAACGAGAA						
Y26-A	TCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAG						
Y3-B	TCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAG						
Y11-A	TCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAG						
Y35-B	TCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAAGAGAACGAGAA						
Y39-A	TCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAAATAGAACAGAACGAGAG						
Y35-A	GAATATCGAAAATATCGAGAAAGATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAG						
Y39-B	GAATATCGAAAATATCGAGAAATATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAA						
Y3-A	GAATATCGAAAATATCGAGAAAGATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACGAGAG						
Y4-B	GAATATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAAGAGAACGAGAG						
Y11-B	TCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAG						
Y4-A	AGATCTAAAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAT-----TACAAAT-ATAG						
Y26-A	AGATCTAAAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAATA-ATAA						
Y3-B	AGATCTAGAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAATA-ATAA						

Y11-A AGATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAATA-ATAA
Y35-B AGATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAT-----TACAAAT-ATAG
Y39-A AGATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAT-----TATAAAT-ATAG
Y35-A AGATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAG-----ACAAT--ACA-
Y39-B AGATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAG-----ACAAT--ACA-
Y3-A AGATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAATAAG-----ACAAT--ACA-
Y4-B AGATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAATAATT-----ACAATT-ATAG
Y11-B AGATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAG-----ACAATACATAA

Y4-A CAATTATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAATAA-----TAATTATAATAA
Y26-A TAATTATAAATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAATAA-----TCATTATAATAA
Y3-B TAATTATAATAATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAATAATAATAATTATAA
Y11-A TAATTATAA--ATA-TAATTATAATAATAATTATAATAA-----TAATAATTATAA
Y35-B CAATTATAATAATTATAATAATAATAATAATTATAATAATAA-----TAATTATAATAA
Y39-A CAATTATAATAATTATAATA-----ATTATAATAA
Y35-A TAATAATAATAATTATAATA-----ATAAT---AA
Y39-B TAATAATAATAATTATAA-----
Y3-A TAATAATAATAATTATAAAA-----ATTAT---AA
Y4-B CAATTATAATAATTATAATA-----ATAATTATAA
Y11-B TAATAATAATAATTATAATAATA-----ATAATTATAA

Y4-A TAATTCTAAAAAATTA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTGT
Y26-A TAATTATAAAAAAATTACAATATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTGT
Y3-B TAATTATAAAAAAATTA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTGT
Y11-A TAATTATAAAAAAATTA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTGT
Y35-B TAATTCTAAAAAATTA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTGT
Y39-A TA-----AAAAGTTA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTGT
Y35-A TTATAAAAAAATTACAA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTATTCCCTGT
Y39-B -----AAAATTACAA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTATTCCCTGT
Y3-A TAATTATAAAAAAATTA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTATTCCCTGT
Y4-B TAATTATAAAAAAATTA---TATTACAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTGT
Y11-B TAATTATAAAAAAATTA---TATTATAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGTTCCCTGT

Y4-A TCCT-----ATTTATTGTGGGGTGAGTACTTATATCTCAATTATAAAAAGAAAGTTTTTT
Y26-A TCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTT
Y3-B TCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTT
Y11-A TCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTT
Y35-B TCCT-----ATTTATTGTGGGGTGAGTACTTATATCTCAATTATAAAAAGAAAGTTTTTT
Y39-A TCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAGAAAGTTTTTT
Y35-A TCCTGTTCCCTATTTATTATGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTT
Y39-B TCCTGTTCCCTATTTATTATGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTT
Y3-A TCCTG-----TTTATTATGGGGTGAGTATTTATATCTCATTTATAAAAAAAGTTTTTT
Y4-B TCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAGAAATTTCTT
Y11-B TCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATGTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTT

Y4-A AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y26-A AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y3-B AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y11-A AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y35-B AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y39-A AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y35-A AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y39-B AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y3-A TACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y4-B AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC
Y11-B AACAAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC

Y4-A ATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCATTTCCACGATTC
Y26-A ATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCGTTTCCACGATTC
Y3-B ATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTG-----
Y11-A ATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATTC

Y35-B ATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCATTTCCACGATTC
Y39-A ATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATTC
Y35-A ATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGATATATTGGTCCACCAACATCATTTCACGATTC
Y39-B ATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATTAACACCATTTCCACGATTC
Y3-A ATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCATTTCCACGATTC
Y4-B ATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGATATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATTC
Y11-B ATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCATTTCCACGATTC

Y4-A ATTCCTCCAAATGCGTACAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGA-----
Y26-A ATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTAT
Y3-B -----
Y11-A ATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGNATGTTATGAATTTAT
Y35-B ATTCCTCC-----
Y39-A ATTCCTCC-----
Y35-A ATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTAT
Y39-B ATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTAT
Y3-A ATTCCTCCAAATGCGTAT-----
Y4-B ATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTAT
Y11-B ATTCCTCCAAATGCGTATAGACTTCGTCCATCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTAT

Y4-A -----
Y26-A ATTGATGCACATAGTATTAAATGCTGTATTAAATTTTCGCTTTTTTTTTTAGGATTTGGAC
Y3-B -----
Y11-A ATTGATGCACATAG-----
Y35-B -----
Y39-A -----
Y35-A ATTGATGCACATGGTATTAAATGCTGTATTAAATTT-----
Y39-B A-----
Y3-A -----
Y4-B ATTG-----
Y11-B ATTGATGCACATAGTAGACNATATGAAAAATTACACAATGAAT-----

Y4-A -----
Y26-A CTACGCATCAATGAAAA
Y3-B -----
Y11-A -----
Y35-B -----
Y39-A -----
Y35-A -----
Y39-B -----
Y3-A -----
Y4-B -----
Y11-B -----

Anexo IV. Alineamiento de las secuencias entre alelos pertenecientes a la línea de selección Y11

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS 11-B e Y4-B

Porcentaje de pares de bases idénticas: 93,6%

	10	20	30	40	50	60	
	----	----	----	----	----	----	
Consensus	AAGAAAAATTTT	TAGAAAGAA	GAACRAGTC	GTAAGCGYTAT	TCTCGTTCA	AGAGAACGAG	
Y4-B	-.....N.N.....	N.g...N..N....	c.....				
Y11-B	a.....	t.....				
	70	80	90	100	110	120	
	----	----	----	----	----	----	
Consensus	AGCAAAAGTAT	GAAACGAAAT	TATATGAAAT	ATRTNNRAT	TATATCATAT	TTTGTAAAAAT	T
Y4-B	g.--a.....					
Y11-B	a.CAg.....					
	130	140	150	160	170	180	
	----	----	----	----	----	----	
Consensus	GAATTTTAAT	TAAATATTT	TATTACAGY	TCGTATAAAA	ATGAAARWK	MWTATCGAA	AATA
Y4-B	t.....	gagaa.....				
Y11-B	c.....	attct.....				
	190	200	210	220	230	240	
	----	----	----	----	----	----	
Consensus	TCGAGAAAC	ATCGAAAGA	ACGATCTCG	AGATAGAAS	AGAACGAG	AGAGATCTA	RAGAACC
Y4-B	g.....	a.....				
Y11-B	c.....	g.....				
	250	260	270	280	290	300	
	----	----	----	----	----	----	
Consensus	TAAAAATAAT	TTTCATCTT	TATCGAAYA	ANKACAATW	NATARYAAT	WATAATWAT	WATAATA
Y4-B	t..Tt.....	t-...gc...ta..t....			
Y11-B	c.-g.....	aC...at...at..a....			
	310	320	330	340	350	360	
	----	----	----	----	----	----	
Consensus	ATAATTATA	AATAATTAT	AAAAAATT	TATTAYAA	TATTAWTW	ATATTGAAC	AAATTCCTG
Y4-B	c.....	a.t.....				
Y11-B	t.....	t.a.....				
	370	380	390	400	410	420	
	----	----	----	----	----	----	
Consensus	TTCTGTTCCT	GTTTCCTAT	TTTATTGT	GGGGTGAGT	ATKTATAT	CTCAATTAT	AAAAARAAA
Y4-B	t.....	g...				
Y11-B	g.....	a...				
	430	440	450	460	470	480	
	----	----	----	----	----	----	
Consensus	RTTTYTTAA	CAATATTA	AATTTTCAT	TATTAGAA	TTTTCCAC	CAAGACCA	ATGGGACCTTG
Y4-B	a...c.....						
Y11-B	g...t.....						

	490	500	510	520	530	540
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	GATTTCAATRCAAGAACAAATACCAAGATTTAGRYATATTGGTCCAYCAACACCATTTC					
Y4-Bg.....at.....c.....					
Y11-Ba.....gc.....t.....					
	550	560	570	580	590	600
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	ACGATTCATTCCTCCAAATGCGTATAGAYTTCGTCCAYCTCTAAATCCTAGTATGTTATG					
Y4-Bt.....c.....					
Y11-Bc.....t.....					
	610	620	630	640	650	
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	
Consensus	AATTTATATTGATGCACATAGTAGACNATATGAAAAATTACACAATGAAT					
Y4-B-----					
Y11-B					

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y11-B E Y39-A

Porcentaje de pares de bases idénticas: 94,5%

	10	20	30	40	50	60
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	AAGAAAAATTTT TAGAAGAAAGACAAGTCGTAARCGTTATTCTCGTTCAAGAGAACGAG					
Y11-Bg.....					
Y39-A	----.a.....					

	70	80	90	100	110	120
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	AGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAARTATATSAGATATATCATATTTGTTAAAAATT					
Y11-Ba.....c.....					
Y39-Ag.....g.....					

	130	140	150	160	170	180
	----:----	---.:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	GAATTTTAATTAA-NATTTTATTACAGMTCRTATAAAAAATGAAAATTCCTATCGAAAATA					
Y11-BAT.....c..g.....					
Y39-A--.....a..a.....					

	0	190	200	210	220	230	240
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	TCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGARATAGAACGAGAGAGATCTARAGAACC						
Y11-Bg.....g.....						
Y39-Aa.....a.....						

	0	250	260	270	280	290	300
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	TAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAANNNNNNWYATAAWWATARYAATTATAATAATWA						
Y11-BGACAAAc....ta...at.....a.						
Y39-A-----tt....at...gc.....t.						

	0	310	320	330	340	350	360
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	TAATWATWATAATWATAAAAAARTTATATTAYAATATTATTAATATTGAACAAATTCCTGT						
Y11-Bt..a....t.....a.....t.....						
Y39-Aa..t....a.....g.....c.....						

	0	370	380	390	400	410	420
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	TCCTGTTCCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATKTATATCTCAATTATAAAARAAAG						
Y11-Bg.....a.....						
Y39-At.....g.....						

	0	430	440	450	460	470	480
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	TTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGG						
Y11-B						
Y39-A						

	0	490	500	510	520	530	540
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	ATTTCAATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCAYCAACACCATTTC						
Y11-Bt.....						
Y39-Ac.....						

0 550 560 570 580 590 600

|---:---|---:---|---:---|---:---|---:---|---:---|

Consensus CGATTCATTCCCTCCAAATGCGTATAGACTTCGTCATCTCTAAATCCTAGTATGTTATGA

Y11-B

Y39-A

0 610 620 630 640

|---:---|---:---|---:---|---:---|---:---|

Consensus ATTTATATTGATGCACATAGTAGACNATATGAAAAATTACACAATGAAT

Y11-B

Y39-A

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y11-A E Y35-B

Porcentaje de pares de bases idénticas: 93,1%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	TTATAATGAAAAAGAAAAATTTT	TAGAAGAAACAAGTCGTGAGCGTTAT	TCTCGTTC			
Y11-A	A.....				
Y35-B	-----				
	70	80	90	100	110	120
Consensus	AAGAGAACRAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCARATATATCATATT					
Y11-Ag.....	g.....				
Y35-Ba.....	a.....				
	130	140	150	160	170	180
Consensus	TGTTAAAAATTGAATTTTAATTAANNATTTTATTACAGMTCRTATAAAAAATGAAAATTCT					
Y11-A	AT.....	c.g.....			
Y35-B	--.....	a.a.....			
	190	200	210	220	230	240
Consensus	TATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAASAGAACGAGARAGA					
Y11-A	c.....	g...			
Y35-B	g.....	a...			
	250	260	270	280	290	300
Consensus	TCTARAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACANNNNNAWTACANAATANTARYAAT					
Y11-Ag.....	AGAC.a....	T....	A..at...		
Y35-Ba.....	----.t....	-....	-..gc...		
	310	320	330	340	350	360
Consensus	TATAAWWATWATWATAATAATAATTATAATAATAATAATTANNNTAATAATMTAAAAAA					
Y11-Aat..a..t.....	---	a.....			
Y35-Bta..t..a.....	TAA.....	c.....			
	370	380	390	400	410	420
Consensus	TTATATTACAATATTAWTWATATTGAACAAATTCNNNNNNCTGTTCTGTTCTCTATTAT					
Y11-A	a.t.....	CTGTTC.....			
Y35-B	t.a.....	-----			
	430	440	450	460	470	480
Consensus	TGTGGGGTGAGTAYTTATATCTCAATTATAAAAAAAAGTTTTTTTAAACAATATTAAATTC					
Y11-A	t.....	a.....			
Y35-B	c.....	g.....			
	490	500	510	520	530	540
Consensus	ATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTCAATRCAGAACAATAAC					
Y11-A	g.....				
Y35-B	a.....				

	550	560	570	580	590	600
	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Consensus	CAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCACGATTCATTCTCCAAATGCGT					
Y11-A					
Y35-BC.....T.....-----					
	610	620	630	640	650	
	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Consensus	ATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGNATGTTATGAATTTATATTGATGCACATAG					
Y11-A					
Y35-B	-----					

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y4-B E Y3-A

Porcentaje de pares de bases idénticas: 92,0%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	AGAAAAATTTT	TAGAAGAA	GAACRAGTCG	TAAGCGCTAT	TCTCGTTCA	AGAGAACGAGA
Y4-B	--.....a.....
	70	80	90	100	110	120
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	GCAAAAGTATG	AAACGAAAT	TATAYGAAAT	ATRTNNRAT	ATATCATAT	TTTTRTTAAAA
Y4-Bc.....a.CAg.....a.....a.....a.....a.....
	130	140	150	160	170	180
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	AATTTTAATT	TAAATATTT	TATTACAGY	TCGTATAAAA	ATGAAAGAG	AATATCGAAA
Y4-Bc.....t.....g.--a.....g.....g.....g.....
	190	200	210	220	230	240
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	CGAGAAASAT	CGAAAGAAC	GATCTCGAG	ATAGAASRG	AACGAGAG	AGATCTAAAG
Y4-Bg.....cg.....ga.....
	250	260	270	280	290	300
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	AAAAATAATT	TCATCTTT	TATCGAATA	ANKACAAT	NAYANNNN	TWATAATA
Y4-B-g.....-c.----a.....a..t....a.....a.....
	310	320	330	340	350	360
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	AATTATAATA	ATTATAAAAA	ATTATATT	ACAATATTA	ATTATATT	GAAACAAAT
Y4-Bg..
	370	380	390	400	410	420
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	CCTGTTCTG	NNNNNTTT	TATRTTGG	GGTGAGTAT	TTTATATCT	CAWTTATA
Y4-Ba.....t.....a...g.
	430	440	450	460	470	480
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	TTYTTWACA	ATATTAAAT	TCATTATT	AGAAATTT	TCCACCAAG	ACCAATGGG
Y4-B	..t..t.....
	490	500	510	520	530	540
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- -----					
Y3-A	TTTCAATRCA	AGAACAAAT	ACCAAGATT	TAGRYATAT	TGGTCCAYC	AACACCAT
Y4-Ba.....gc.....t.....

Y4-B g.....at.....C.....

 550 560 570 580 590 600

 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|

Consensus GATTCATTCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAA

Y3-A -----

Y4-B

 ----:----

Consensus TTTATATTG

Y3-A -----

Y4-B

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y4-A E Y26-A

Porcentaje de pares de bases idénticas: 93,4%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	ATTACACAATGAAAAAGAAAACTTTTAGAAGAAAGAACGAGTCGTAAGCGCTATTCTCG					
Y26-A					
	70	80	90	100	110	120
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	TTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCARATATATCAT					
Y26-Aa.....					
	130	140	150	160	170	180
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	ATTTGTAAAAATTGAATTTTAATTAAATWTTATTACAGATCATATAAAAAATGARAATTC					
Y26-At.....a.....					
	190	200	210	220	230	240
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	TTATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAASRGAACGAGARAG					
Y26-Aga.....a..					
	250	260	270	280	290	300
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	ATCTAAAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACANNNNAWTACANAATNATARYAA					
Y26-At....-...-...gc..					
	310	320	330	340	350	360
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	TTATAAWWATWATWATAATAATAATTATAATAATAATMATTTATAATANTAATMTAAAAA					
Y26-Ata..t..a.....a.....-.....c.....					
	370	380	390	400	410	420
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	ATTANNTATTACAAATATTATTAATATTGAACAAATNNNNNTCCTGTTCTCTGTTCTTAT					
Y26-ACAA.....TCCTGT.....					
	430	440	450	460	470	480
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	TTATTGTGGGGTGAGTAYTTATATCTCAATTATAAAAAARAAAGTTTTTTTAAACAATATTAAA					
Y26-Ac.....g.....					
	490	500	510	520	530	540
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y4-A	TTTCATTATTAGAAAYTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTCAATACAAGAACAA					
Y26-At.....					

		550	560	570	580	590	600
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus		ATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCRTTTCCACGATTCATTCCTCCAAAT					
Y4-A	a.....					
Y26-A	g.....					
		610	620	630	640	650	660
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus		GCGTAYAGATTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTATATTGATGCACAT					
Y4-A	c.....-----					
Y26-A	t.....					
		670	680	690	700	710	720
		----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus		AGTATTAAATGCTGTATTAATTTTTCGCTTTTTTTTTTAGGATTTGGACCTACGCATCAAT					
Y4-A		-----					
Y26-A						

Consensus		GAAAA					
Y4-A		----					
Y26-A						

Anexo V. Secuencias alineadas de los alelos obtenidos en el primer ciclo de selección de la línea de Y13

	1	10	20	30	40	50	60
Y22-A							
Y22-B							
Y27-A							
Y27-B							
Y38-A							
Y38-B							
Y40-A							
Y40-B							
Y22-A	-----TTTTTAGAAGAAAGAACGAGTCGTAAGCGTTATTCTC						
Y22-B	-----TTTTTAGAAGAAAGAACGAGTCGTAAGCGTTATTCTC						
Y27-A	-----TTTTTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTC						
Y27-B	-----TTTTTAGAAGAAAGAACGAGTCGTAAGCGTTATTCTC						
Y38-A	AATTACACAATGAAAAAGAAAACTTTTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTC						
Y38-B	---TACACAATGAAGAAGAAAACTTTTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGCTATTCTC						
Y40-A	AATTACACAATGAAAAAGAAAACTTTTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCCC						
Y40-B	-----GAAAAATTTTAGAAGAAAGAACGAGTCGTAAGCGCTATTCTC						
Y22-A	GTTCAAGAGAACAAAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCA-----GAT						
Y22-B	-----GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATGA-----GAT						
Y27-A	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATGA-----GAT						
Y27-B	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATGA-----GAT						
Y38-A	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCA-----GAT						
Y38-B	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCA-----GAT						
Y40-A	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCATATTATCAT						
Y40-B	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCA-----GAT						
Y22-A	A-TA-----TCATATTTATTAAACATTGAATTTTAAATTAAATA-----TTTT-						
Y22-B	-----TCATATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAATT-----TT---						
Y27-A	A-TA-----TCATATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAATT-----TT---						
Y27-B	AT-A-----TCATATTTGTTACAAATTGAATTTTAAATTAAATTATTTTATTTTAA						
Y38-A	A-TA-----TCATATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAATA-----TTTT						
Y38-B	A-TA-----TCATATTTATTAAAAATTAAATTTTAAATTAAATA-----TTTT						
Y40-A	ATTATATATCATATATCATATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAATA-----TTTT						
Y40-B	A-TA-T-----CATATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAAATA-----TT						
Y22-A	ATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGAGAATATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAAC						
Y22-B	ATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAATTCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAAC						
Y27-A	ATTACAGATCATATAAAAAATGAAAATTCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAAC						
Y27-B	ATTACAGATCATATAAAAAATGAAAGAGAATATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAAC						
Y38-A	ATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAATTCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAAC						
Y38-B	ATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGAGAATATCGAAAATATCGAGAAAGATCGAAAGAAC						
Y40-A	ATTACAGGTCATATAAAAAATGAAAGAAAATATCGAAAATATCGAGAAAGATCGAAAGAAC						
Y40-B	ATTACAGATCGTATAAAAAATGAAAATTCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAAC						
Y22-A	GATCTCGAGATAGAACCGGAACGAGAGAGATCTAGAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTAT						
Y22-B	GATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAGAGATCTAGAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTAT						
Y27-A	GATCTCGAAATAGAACAGAACGAGAGAGATCTAAAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTAT						
Y27-B	GATCTCAAGATAGAACCGGAACGAGAGACATCTAAAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTAT						
Y38-A	GATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAGAGATCTAGAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTAT						
Y38-B	GATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAGAGATCTAAAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTAT						
Y40-A	GATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAGAGATCTAAAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTAT						
Y40-B	GATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAGAGATCTAGAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTAT						
Y22-A	CGAACAAG-ACAATACATAATAATA-----ATTAT						
Y22-B	CGAACAAG-ACAATACATAATAATAATAATTATA-----TAATAATAATAATTATAAT						
Y27-A	CGAACA-----TTATA-----AAT-----ATAGC						
Y27-B	CGAACAATTACAA-ATATAGCAAT-----TATAAT						
Y38-A	CGAACAAG-ACAATACATAATAATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAATTATAAT						
Y38-B	CGAACAAG-ACAATACA-----T						
Y40-A	CGAACAAG-ACAATACATAATAATAATAATAATTATAATAATAATAATAATAATAATAAT						

Y40-B CGAACAAG-ACAATACATAATA-----ATAAT

Y22-A AAATATAATTATAATAATAATAATTATAAAAAATTACAATATTACAATATTATTAAT
Y22-B AATTATAATA---ATAATTATAATAATTATAAAAAATT---ATATTACAATATTAAATTAT
Y27-A AATTATAATAATTATAATAATTATAATAATAAAAAAGTT---ATATTACAATATTATTAAT
Y27-B AATTATAATA---ATAATTATAATAATTATAAAAAATTATACAAAAATTATATTATTAAT
Y38-A AATTATAATAATAATAATTATAATAATTATAAAAAATT---ATATTACAATATTAAATTAT
Y38-B AATAATAATAATTATAATAATAATAATTATAAAAAATTACAATATTACAATATTAAATTAT
Y40-A TATAATAATAATTATAATAATAATAATTATAAAAAATTACAATATTACAATATTAAATTAT
Y40-B AATTATAAATATAATTATAATAATAATTGTAAAAAATT---ATATTACAATATTAAATTAT

Y22-A ATTGAACAAATTCCCTGTTCCCTGTTCCCT-----ATTTATTGTGGGGTAAGTATTTATATC
Y22-B ATTGAACAAATTCCCTGTTCCCTGTTCCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATC
Y27-A ATTGAACAAATTCCCTGTTCCCTGTTCCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATC
Y27-B ATTGAACAAATTCCCTGTTCCCTGTTCCCTG-----TTTATTATGGAGTGAGTATTTATATC
Y38-A ATTGAACAAATTCCCTGTTCCCTGTTCCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATC
Y38-B ATTGAACAAATTCCCTATTCCCTGTTCCCTGTTCCCTATTTATTATGGGGTGAGTATTTATATC
Y40-A ATTGAACAAATTCCCTATTCCCTGTTCCCTGTTCCCTATTTATTATGGGGTGAGTATTTATATC
Y40-B ATTGAACAAATTCCCTATTCCCTGTTCCCTG-----TTTATTATGGGGTGAGTATTTATATC

Y22-A TCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAA
Y22-B TCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAA
Y27-A TCAATTATAAAAAGAAAGTTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAA
Y27-B TCAATTATAAAACAAAGTTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAA
Y38-A TCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAA
Y38-B TCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAA
Y40-A TCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAA
Y40-B TCAATTATAAAAAGAAAGTTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAA

Y22-A GACCAATGGGACCTTGGATTTCAATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTC
Y22-B GACCAATGGGACCTTGGATTTCAATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTC
Y27-A GACCAATGGGACCTTGGATTTCAATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTC
Y27-B GACCAATGGGACCTTGGATTTCAATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTC
Y38-A GACCAATGGGACCTTGGATTTCAATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTC
Y38-B GACCAATGGGACCTTGGATTTCAATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGATATATTG---
Y40-A GACCAATGGGACCTTGGATTTCAATACAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTC
Y40-B GACCAATGGGACCTTGGATTTCAATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGATATATTGGTC

Y22-A CACCAACACCATTTCCACGATTCATTCCCTCCAAATGCG-----
Y22-B CACCAACACCATTTCC-----
Y27-A CACCAACACCATTTCCACGATTCATTCC-----
Y27-B CACCAACATCATTTCCACGATTCATTCCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTTCCACCTCTAA
Y38-A CACCAACACCATTTCCACGATTCATTCCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTTCCACCTCTAA
Y38-B -----
Y40-A CATTAACACCATTTCCACGATTCATTCCCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTTCCACCTCTAA
Y40-B CACCAACACCATTTCCACGATTCATTCCCTCCAAATGCG-----

Y22-A -----
Y22-B -----
Y27-A -----
Y27-B ATCCT-----
Y38-A ATCCTAGTATGTTATGAATTTATATTGATGCACATAGTATTAAATGCTATATTAATTTTT
Y38-B -----
Y40-A ATCCTAGTATGTTATGAATTTATATTGATGCACATAGTATTAAATGCTGTATTAATTTTT
Y40-B -----

Y22-A -----
Y22-B -----
Y27-A -----
Y27-B -----
Y38-A CGTTTTTTTTTTTT-----

Y38-B -----
Y40-A CGTTTTTTT TAGGATTTGGACCTACACATCAATGAAAAATATGAAAATTTTATATAATAA
Y40-B -----

Y22-A -----
Y22-B -----
Y27-A -----
Y27-B -----
Y38-A -----
Y38-B -----
Y40-A AAAGTTAATGATGCGAACATA
Y40-B -----

Anexo VI. Alineamiento de las secuencias entre alelos pertenecientes a la línea de selección Y13

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y11-B E Y40-B

Porcentaje de pares de bases idénticas: 94,8%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y11-B	AAGAAAAATTTT	TAGAAAGAAAC	RAGTCGTAAG	CGCTATTCTCG	TTCAAGAGAAC	GAG
Y40-B	---	---	---	---	---	---
	70	80	90	100	110	120
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y11-B	AGCAAAAGTATG	AAACGAAATAT	AYGAAATATAT	CAGATATATCA	TATTTGTTAAAA	AATT
Y40-B	---	---	---	---	---	---
	130	140	150	160	170	180
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y11-B	GAATTTTAATTW	AATATTTNATT	CAGMTCGTATA	AAAAATGAAA	ATTCCTTATCG	AAAATA
Y40-B	---	---	---	---	---	---
	190	200	210	220	230	240
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y11-B	TCGAGAAACATC	GAAAGAACGAT	CTCGAGATAGA	ACAGAACGAG	AGAGATCTAGA	GAAACC
Y40-B	---	---	---	---	---	---
	250	260	270	280	290	300
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y11-B	TAAAATAATTT	CATCTTTATCG	AACAAGACAAT	ACATAATAATA	AATTATAA	WWATAA
Y40-B	---	---	---	---	---	---
	310	320	330	340	350	360
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y11-B	TWATWATAATA	ATTRTAAAAA	ATTATATTAYA	ATATTAWTW	ATATTGAACA	AATTCCTRT
Y40-B	---	---	---	---	---	---
	370	380	390	400	410	420
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y11-B	TCCTGTTCTG	NNNNNTTTAT	TRTGGGGTG	AGTATKTAT	ATCTCAATT	TAAAAA
Y40-B	---	---	---	---	---	---
	430	440	450	460	470	480
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y11-B	TTTTTTAACA	ATATTAAAT	TTTCATTATT	AGAAATTTCC	ACCAAGACCA	AATGGGACCT
Y40-B	---	---	---	---	---	---

	490	500	510	520	530	540
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	ATTTCAATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGAYATATTGGTCCAYCAACACCATTTC					
Y11-BA.....Gc.....t.....					
Y40-Bt.....c.....					
	550	560	570	580	590	600
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	CGATTCATTCTCCAAATGCGTATAGACTTCGTCCATCTCTAAATCCTAGTATGTTATGA					
Y11-B					
Y40-B					
	610	620	630	640		
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	ATTTATATTGATGCACATAGTAGACNATATGAAAAATTACACAATGAAT					
Y11-B					
Y40-B	-----					

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y11-A E Y38-A

Porcentaje de pares de bases idénticas: 97,9%

	10	20	30	40	50	60	
Consensus	----	----	----	----	----	----	
Y11-A	AATTACACAATGAAAAAGAAAAAYTTT	TAGAAGAAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTC					
Y38-A	--...T--.....t.....						
	70	80	90	100	110	120	
Consensus	----	----	----	----	----	----	
Y11-A	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCA						
Y38-A						
	130	140	150	160	170	180	
Consensus	----	----	----	----	----	----	
Y11-A	TATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAA						
Y38-A						
	190	200	210	220	230	240	
Consensus	----	----	----	----	----	----	
Y11-A	TTCTTATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGA						
Y38-A						
	250	260	270	280	290	300	
Consensus	----	----	----	----	----	----	
Y11-A	GAGATCTAGAGAACCTAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAATAATAA						
Y38-A						
	310	320	330	340	350	360	
Consensus	----	----	----	----	----	----	
Y11-A	TAATTATAANNATA-TAATTATANNNNNNATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAA						
Y38-ATA...A.....ATAATT.....						
	0	370	380	390	400	410	420
Consensus	----	----	----	----	----	----	----
Y11-A	TTATAAAAAATTATATTACAATATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTCTGTTCTGTT						
Y38-A						
	0	430	440	450	460	470	480
Consensus	----	----	----	----	----	----	----
Y11-A	TCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAACAAT						
Y38-A						
	0	490	500	510	520	530	540
Consensus	----	----	----	----	----	----	----
Y11-A	ATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTCAATGCAA						
Y38-A						

	0	550	560	570	580	590	600
	----	:----	----	:----	----	:----	----
Consensus	GAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCACGATTCATTCCT						
Y11-A						
Y38-A						
	0	610	620	630	640	650	660
	----	:----	----	:----	----	:----	----
Consensus	CCAAATGCGTATAGATTTTCGTCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTATATTGAT						
Y11-AN.....						
Y38-A						
	0	670	680	690	700		
	----	:----	----	:----	----		
Consensus	GCACATAGTATTAAATGCTATATTAATTTTTTCGTTTTTTTTTTTTT						
Y11-A-----						
Y38-A						

Anexo VII. Secuencias alineadas de los alelos obtenidos del apiario de Nueno (línea de mejora AB)

	1	10	20	30	40	50	60
AB346-A							
AB359-A	----	AATTACACAATGAAAAAGAAAAACTTTT	AGAAAGAAACAAGTCGTAAGCGTTATT				
AB359-B	-----	AAGAAAAATTTT	AGAAAGAAACAAGTCGTAAGCGCTATT				
AB346-A	CTCGTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATA						
AB359-A	CTCGTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAAGAAATATATGAAATATATCAGATATA						
AB359-B	CTCGTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCAGATATA						
AB346-A	TCATATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGA						
AB359-A	TCATATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAATATTTTATTATAGGTCATATAAAAAATGA						
AB359-B	TCATATTTATTAAAAATTAAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGA						
AB346-A	AAATTCTTATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACG						
AB359-A	AAGAGAATATCGAAAAATATGGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACG						
AB359-B	AAGAGAATATCGAAAAATATCGAGAAAGATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACGGAACG						
AB346-A	AGAGAGATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAA-GACAATA-----						
AB359-A	AGAGAGATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAATTACAAATATAGCAA						
AB359-B	AGAGAGATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAATAA-GACA-----						
AB346-A	-CATAATAATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAATTATAATAATTATAATAATAA						
AB359-A	TTATAATAATTATAATAATAATTATAATAATAATTATAATAATTATAATAATTATAATAATAA						
AB359-B	-----ATAC--ATAATAATAATAATTATAAAAAATTATAATAATTATAA----AA						
AB346-A	TAATTATAATAATTATAAAAAATTATATTACAATATTAATTATATTGAACAAATTCCTGT						
AB359-A	TTATAATAATAATTATAAAAAATTATATTACAATATTAATTATATTGAACAAATTCCTGT						
AB359-B	--ATTATAATAATTATAAAAAATTATATTACAATATTAATTATATTGAACAAATTCCTAT						
AB346-A	TCCTGTTCCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAG						
AB359-A	TCCTGTTCCCTGTTCCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAGAAAA						
AB359-B	TCCTGTTCCCTG-----TTTATTATGGGGNGAGTNTTTATATCTNATTTATNAAAAAAG						
AB346-A	TTTTTTAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGG						
AB359-A	TTTCTTAACAATATTAAATTTTATTATTAGAATTTTCCACCAAGATCAATGGAACCTTGG						
AB359-B	TTTTTTTACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGG-----						
AB346-A	ATTTCAATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCCA						
AB359-A	ATTTCGATGCAAGAACAAATACCAAGATTTAGGCATATTGGTCCATCAACACCATTTCCA						
AB359-B	-----						
AB346-A	CGATTCATTCTCCNAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTT----						
AB359-A	CGATTCATTCTCCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTTTGA						
AB359-B	-----						
AB346-A	-----ATGAATTTATATTGATGCACATAGTATTAAATGCTATATTAATTTTTTCGTTTT						
AB359-A	ATTATTGATGAATTTATATTGATGCACATAGTATTAAATGCT-TAATAATTTTTGATTATA						
AB359-B	-----						
AB346-A	TTTTTT-----						
AB359-A	TATGCTGATTATAAATGCTTATTAAATTTTTTCGCTTTTTTTTTTTTAGGA						
AB359-B	-----						

Anexo VIII. Alineamiento de las secuencias entre alelos pertenecientes a las líneas Y11, Y13, AB346 y AB359

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y3-B Y AB346-A

Porcentaje de pares de bases idénticas: 99,5%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	AATTACACAATGAAAAAGAAAACTTTTAGAAGAAAGAACAGTCGTAAGCGTTATTCTC					
Y3-B					
	70	80	90	100	110	120
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCA					
Y3-B					
	130	140	150	160	170	180
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TATTTGTTAAAAATTGAATTTTAAATTAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAA					
Y3-B					
	190	200	210	220	230	240
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TTCTTATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGA					
Y3-B					
	250	260	270	280	290	300
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	GAGATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAATAATAA					
Y3-B					
	310	320	330	340	350	360
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TAATTATAATAATAATAATTAT---AATAATTATAATAATTATAATAATAATAATTATAA					
Y3-B					
	360	370	380	390	400	410
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TAATTATAAAAAATTATATTACAATATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTTCCTGTTCC					
Y3-B					
	420	430	440	450	460	470
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TGTTCCATTATTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAAC					
Y3-B					

	480	490	500	510	520	530	540
	-- -----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----
Consensus	AATATTAAATTTTCATTATTAGAAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTC AATG						
AB346-A						
Y3-B						
	540	550	560	570	580	590	600
	-- -----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----
Consensus	CAAGAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTC CACGATTTCATT						
AB346-A						
Y3-B						
	600	610	620	630	640	650	660
	-- -----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----
Consensus	CCTCCNAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTATATT						
AB346-A						
Y3-B	-----						
	660	670	680	690	700		
	-- -----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----:----	-----	
Consensus	GATGCACATAGTATTAAATGCTATATTAATTTTTTCGTTTTTTTTTTTT						
AB346-A						
Y3-B	-----						

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y22-B E AB346-A

Porcentaje de pares de bases idénticas: 97,2%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	AATTACACAATGAAAAAGAAAACTTTTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTC					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	70	80	90	100	110	120
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCA					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	130	140	150	160	170	180
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TATTTGTTAAAAATTGAATTTTAATTAAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAA					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	190	200	210	220	230	240
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TTCTTATCGAAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGA					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	250	260	270	280	290	300
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	GAGATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAATAATAA					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	310	320	330	340	350	360
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TAATTATAATAATAATAATTATAATAATTATAATAATTATAATAATAATAATTATAATAA					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	370	380	390	400	410	420
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TTATAAAAAATTATATTACAATATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTTCCTGTTTCCTGT					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	430	440	450	460	470	480
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TCCTATTTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAACAAT					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	490	500	510	520	530	540
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	ATTAAATTTTCATTATTAGAAATTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTCAATGCAA					
Y22-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	550	560	570	580	590	600
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	GAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATTCATTCCT					
AB346-A					
Y22-B-----					
	610	620	630	640	650	660
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	CCNAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTATATTGAT					
AB346-A					
Y22-B	-----					
	670	680	690	700		
	----:----	----:----	----:----	----:----	----	----
Consensus	GCACATAGTATTAAATGCTATATTAATTTTTTCGTTTTTTTTTTT					
AB346-A					
Y22-B	-----					

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS AB346-A E Y38-A

Porcentaje de pares de bases idénticas: 99,9%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	AATTACACAATGAAAAAGAAAACTTTTAGAAGAAAGAACAGTCGTAAGCGTTATTCTC					
Y38-A					
	70	80	90	100	110	120
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTATGAAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCA					
Y38-A					
	130	140	150	160	170	180
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TATTTGTTAAAAATTGAATTTTAATTAAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAA					
Y38-A					
	190	200	210	220	230	240
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TTCTTATCGAAAATATCGAGAAACATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGA					
Y38-A					
	250	260	270	280	290	300
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	GAGATCTAGAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATTCGAACAAGACAATACATAATAATAA					
Y38-A					
	310	320	330	340	350	360
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TAATTATAATAATAATAATTATAATAATTATAATAATTATAATAATAATAATAATAATAA					
Y38-A					
	370	380	390	400	410	420
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TTATAAAAAATTATATTACAATATTAATTATATTGAACAAATTCCTGTTCTGTTCTGTT					
Y38-A					
	430	440	450	460	470	480
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	TCCTATTTATTGTGGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAAAAAAAGTTTTTTAACAAT					
Y38-A					
	490	500	510	520	530	540
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB346-A	ATTAAATTTTCATTATTAGAAATTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTCAATGCAA					
Y38-A					

	550	560	570	580	590	600
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	GAACAAATACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATTCATTCCT					
AB346-A					
Y38-A					
	610	620	630	640	650	660
	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----	----:----
Consensus	CCAAATGCGTATAGATTTTCGTCCACCTCTAAATCCTAGTATGTTATGAATTTATATTGAT					
AB346-A	..N.....					
Y38-A					
	670	680	690	700		
	----:----	----:----	----:----	----:----	----	----
Consensus	GCACATAGTATTAAATGCTATATTAATTTTTTCGTTTTTTTTTTTTT					
AB346-A-					
Y38-A					

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y3-A Y AB359-B

Porcentaje de pares de bases idénticas: 95,6%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	AAGAAAAATTTT	TAGAAAGAA	GAACAAAGTC	CGTAAGCGCT	ATTCTCGTT	CAAGAGAACGAG
Y3-A	----	----	----	----	----	----
	70	80	90	100	110	120
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	AGCAAAAGTAT	GAAACGAAAT	TATACGAAAT	TATATCAGAT	TATATCATAT	TTTATTAAAAATT
Y3-A	----	----	----	----	----	----
	130	140	150	160	170	180
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	AAATTTTAAT	TAAATATTT	TATTACAGCT	CGTATAAAAA	TGAAAGAGA	AATATCGAAAATA
Y3-A	----	----	----	----	----	----
	190	200	210	220	230	240
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	TCGAGAAAGAT	CGAAAGAAC	GATCTCGAG	ATAGAACGGA	ACGAGAGAG	ATCTAAAGAACC
Y3-A	----	----	----	----	----	----
	250	260	270	280		
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	TAAAAATAAT	TTTCATCTT	TATCGAATA	AAGACAATAC	ATAATA	-----A
Y3-A	----	----	----	----	----	----
	290	300	310	320	330	
340						
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	TAATAATTAT	AAAAATTAT	AATAATTAT	AAAAATTAT	ATTACAATAT	TATTATATTGA
Y3-A	----	----	----	----	----	----
	350	360	370	380	390	400
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	ACAAATTCCT	ATTCCTGTT	CCTGTTTAT	TATGGGGTG	AGTATTTAT	ATCTCATTATATAAA
Y3-A	----	----	----	----	----	----
	410	420	430	440	450	460
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	AAAAAGTTT	TTTACAAAT	ATTAAATTT	CATTATTAGA	ATTTCCACCA	AGACCAATGGGA
Y3-A	----	----	----	----	----	----
	470	480	490	500	510	520
Consensus	----	----	----	----	----	----
AB359-B	CCTTGGATT	TTCAATACA	AGAACAAAT	ACCAAGATT	TAGGCATAT	TGGTCCATCAACACCA
Y3-A	----	----	----	----	----	----

	530	540	550
	--:----- -----:----- -----:----- --		
Consensus	TTTCCACGATTTCATTCCTCCAAATGCGTAT		
AB359-B	-----		
Y3-A		

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y39-A E Y27-A

Porcentaje de pares de bases idénticas: 100%

		10	20	30	40	50	60
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	AAATTTT	TAGAAGAA	GAACAAGT	CGTAAACG	TTATTCTC	GTTCAGAGA
	Y39-A	AAATTTT	TAGAAGAA	GAACAAGT	CGTAAACG	TTATTCTC	GTTCAGAGA
		70	80	90	100	110	120
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	AAGTATG	AAACGAA	ATATATG	AAGTATAT	GAGATAT	ATCATATTT
	Y39-A	AAGTATG	AAACGAA	ATATATG	AAGTATAT	GAGATAT	ATCATATTT
		130	140	150	160	170	180
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	TTAATTAA	ATTTTATT	ACAGATCA	TATAAAAA	TGAAAATT	CTTATCGAA
	Y39-A	TTAATTAA	ATTTTATT	ACAGATCA	TATAAAAA	TGAAAATT	CTTATCGAA
		190	200	210	220	230	240
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	ACATCGAA	AGAACGAT	CTCGAAAT	AGAACGAG	AGAGATCT	AAAGAACCT
	Y39-A	ACATCGAA	AGAACGAT	CTCGAAAT	AGAACGAG	AGAGATCT	AAAGAACCT
		250	260	270	280	290	300
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	ATTTTCAT	CTTTATCG	AACAATT	TATAAAT	TATAGCA	ATTATAA
	Y39-A	ATTTTCAT	CTTTATCG	AACAATT	TATAAAT	TATAGCA	ATTATAA
		310	320	330	340	350	360
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	AATAAAAA	AGTTATAT	TACAATAT	TATTAAT	TATTGAAC	AAATTCCTG
	Y39-A	AATAAAAA	AGTTATAT	TACAATAT	TATTAAT	TATTGAAC	AAATTCCTG
		370	380	390	400	410	420
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	CCTATTT	TATTGTG	GGGTGAG	TATTTAT	ATCTCA	ATTATAA
	Y39-A	CCTATTT	TATTGTG	GGGTGAG	TATTTAT	ATCTCA	ATTATAA
		430	440	450	460	470	480
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	TTAAATTT	CATTATT	AGAATTT	TCCACCA	AGACCA	ATGGGAC
	Y39-A	TTAAATTT	CATTATT	AGAATTT	TCCACCA	AGACCA	ATGGGAC
		490	500	510	520	530	540
	Consensus	----	----	----	----	----	----
	Y27-A	AACAAAT	ACCAAG	ATTAGG	CATATTG	GTCACCA	ACACCAT
	Y39-A	AACAAAT	ACCAAG	ATTAGG	CATATTG	GTCACCA	ACACCAT

	-
Consensus	C
Y27-A	-
Y39-A	.

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALELOS Y35-A E Y38-B

Porcentaje de pares de bases idénticas: 100%

	10	20	30	40	50	60
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	TTACACAATGAAGAAGAAAACTTTTAGAAGAAAGAACAAGTCGTAAGCGCTATTCTCGT					
Y38-B					
	70	80	90	100	110	120
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	TCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGAAACGAAATATACGAAATATATCAGATATATCATA					
Y38-B					
	130	140	150	160	170	180
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	TTTATTAAAAATTAAATTTTAATTAAATATTTTATTACAGCTCGTATAAAAAATGAAAGAG					
Y38-B					
	190	200	210	220	230	240
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	AATATCGAAAAATATCGAGAAAGATCGAAAGAACGATCTCGAGATAGAACAGAACGAGAGA					
Y38-B					
	250	260	270	280	290	300
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	GATCTAAAGAACCTAAAAATAATTTTCATCTTTATCGAACAAGACAATACATAATAATAATA					
Y38-B					
	310	320	330	340	350	360
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	ATTATAATAATAATAATTATAAAAAATTACAATATTACAATATTAATTATATTGAACAAA					
Y38-B					
	370	380	390	400	410	420
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	TTCTATTCTCTGTTCTGTTCTATTTATTATGTTGGGTGAGTATTTATATCTCAATTATAA					
Y38-B					
	430	440	450	460	470	480
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	AAAAAAGTTTTTTTAAACAATATTAAATTTTCATTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATGGG					
Y38-B					
	490	500	510	520	530	540
Consensus	----	----	----	----	----	----
Y35-A	ACCTTGGATTTCATACAGAACAATAACCAAGATTTAGATATATTGGTCCACCAACATC					
Y38-B					

	550	560	570	580	590	600
	----	----	----	----	----	----
Consensus	ATTTCCACGATT	CATTCCTCCAAAT	GCGTATAGATT	TCGTCCACCT	CTAAATCCT	AGTAT
Y35-A
Y38-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	610	620	630	640		
	----	----	----	----	----	----
Consensus	GTTATGAATTT	TATATTGATGC	ACATGGTATT	TAAATGCTGT	ATTAAATTTT	
Y35-A
Y38-B	-----	-----	-----	-----	-----	-----